

LORENA A. G. LARA T. URBANETZ

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE C2, C3,
BF, C4A E C4B DO SISTEMA COMPLEMENTO
NA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cardiologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA
1993

Orientadora

Profa. Dra. Iara José Taborda
de Messias, professora do De-
partamento de Patologia Médica
da Universidade Federal do Pa-
raná.

Trabalho realizado na Disciplina de Cardiologia, Departamento de Clínica Médica e no Laboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Médica/Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com colaboração do Instituto de Microbiologia Médica e Higiene da Universidade de Colônia, Alemanha.

Ao meu querido esposo Almir pelo seu apoio, pela sua forma maravilhosa de ser, pelo seu amor.

Aos meus filhos Lorena Ana Mercedes e Almir Antonio por me oferecerem a incrível experiência de ser mãe.

Aos meus pais pelo apoio e carinho sem limites que sempre me ofereceram, mesmo desde longe. Pela educação e exemplo que me proporcionaram.

A` minha orientadora, Profa.
Dra. Iara José Taborda de Mes-
sias, pesquisadora exemplar,
meu muito obrigado pelo seu
apoio, ensinamentos e orien-
tação neste trabalho, pela sua
amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gastão Pereira da Cunha, Prof. Titular aposentado da Universidade Federal do Paraná e ex-coordenador da pós-graduação em Cardiologia, pelo seu magnífico exemplo como pessoa, docente e pesquisador. Obrigada pelo seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Franco de Oliveira, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Paraná, pelo incentivo e apoio recebidos.

Ao Prof. Dr. Claudio Leinig Pereira da Cunha, Prof. Titular da disciplina de Cardiologia da Universidade Federal do Paraná, pela sua imprescindível colaboração na realização do estudo ecocardiográfico dos pacientes chagásicos.

Ao Dr. Luis Antonio F. Bettini, pelo encaminhamento dos pacientes chagásicos.

Ao Prof. Gottfried Mauff do Instituto de Microbiologia Médica da Universidade de Colônia, Alemanha, pela tipagem de C2 e C4 e envio de reagentes importados utilizados na realização deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Eduardo do Valle Ribeiro pela sua contribuição na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Rui F. Pilotto, Prof. Adjunto do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, pela sua colaboração na análise das frequências gênicas.

Ao Dr. Dieter Mohren e Martina Brenden do Instituto de Microbiologia Médica da Universidade de Colônia, Alemanha, pelo auxílio na análise estatística de C4.

À Profa. Shirley Ramos da Rosa Utiyama pela contribuição na realização deste trabalho.

À Sra. Antonia Schwinden pela revisão do português.

A todos os pacientes chagásicos e indivíduos controles que permitiram sua participação neste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE FOTOS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xviii
INTRODUÇÃO	1
1 SISTEMA COMPLEMENTO	1
1.1 VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	1
1.1.1 Via Clássica	2
1.1.2 Via Alternativa	3
1.1.3 Via Efetora Final	6
1.1.4 Receptores do Complemento	6
1.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO	8
1.2.1 Opsonização e Fagocitose	9
1.2.2 Lesão de Membrana Celular	9
1.2.3 Formação de Anafilotoxinas	10
1.2.4 Quimiotaxia	11
1.2.5 Indução da Resposta Humoral	11
1.2.6 Solubilização de Imunocomplexos	12
1.3 POLIMORFISMO GENÉTICO DO SISTEMA COMPLEMENTO	13
1.3.1 Fator B (BF)	15

1.3.2	C3	17
1.3.3	C2	19
1.3.4	C4	20
1.3.5	Polimorfismo do Complemento e Doenças Associadas com HLA	24
1.3.6	Variedade Alotípica do Complemento e sua Associação com Doenças	25
2	DOENÇA DE CHAGAS	30
2.1	FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS	31
2.1.1	Forma Aguda	31
2.1.2	Forma Crônica	31
2.1.2.1	Forma Indeterminada	31
2.1.2.2	Forma Cardíaca	34
I	Cardiopatia Chagásica Subaguda	34
II	Cardiopatia Chagásica Crônica com Agudização	35
III	Cardiopatia Chagásica Crônica Descompensada	36
IV	Cardiopatia Chagásica Crônica Compensada	36
V	Forma Digestiva	37
2.2	ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS	37
2.3	COMPLEMENTO E DOENÇA DE CHAGAS	39
2.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO <i>Trypanosoma cruzi</i> À LI- SE INDUZIDA POR COMPLEMENTO	40
3	OBJETIVO DO ESTUDO	43
4	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	PACIENTES	44
4.2	CONTROLES	47
4.3	PLASMA E SORO	47
4.4	TIPAGEM DO FATOR B (BF)	48
4.5	TIPAGEM DE C3	49

4.6	TIPAGEM DE C2	50
4.7	TIPAGEM DE C4	51
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS

BF = Fator B

C2 = Segundo componente do Complemento

C3 = Terceiro componente do Complemento

C4 = Quarto componente do Complemento

CLM = Complexo Lítico de Membrana

CPH = Complexo Principal de Histocompatibilidade

CR1 = Receptor para C3b, C4b

DAF = Fator acelerador da degradação

EDTA = Ácido etileno diamino tetra acético

H = Fator H

I = Fator I

P = Properdina

PBS = Solução salina com fosfato

TDAF = Fator da forma tripomastigota do *T.cruzi* que acelera a
degradação

TrDAF = Fator da forma tripomastigota do *T.cruzi* que acelera a

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Seqüência da ativação das vias clássica e alter- nativa do Sistema Complemento	7
Figura 2 - O complexo principal de histocompatibilidade (CPH) no cromossoma 6	15
Figura 3 - Alótipos comuns e raros de BF	16
Figura 4 - Alótipos comuns e raros de C3	18
Figura 5 - Representação esquemática do polimorfismo de C2	19
Figura 6 - Distâncias relativas de migração dos alótipos de C4A e C4B	23
Figura 7 - Hipótese da restrição alotípica dos produtos gê- nicos da classe I, II e III do CPH nas reações imunológicas da defesa do hospedeiro	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Receptores do complemento	8
Quadro 2 - Atividades biológicas dos componentes do sistema complemento	10
Quadro 3 - Haplótipos de alto risco em doenças	27
Quadro 4 - Alelos de C3, BF, C4 e C2 associados com doenças	29

LISTA DE FOTOS

Foto 1 - Alótipos de C3 detectados através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose	58
Foto 2 - Alótipos de BF detectados através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose e imunofixação	60
Foto 3 - Alótipos de C4A e C4B observados após eletroforese em gel de agarose seguida de imunofixação, com soros tratados com neuraminidase e neuraminidase + carboxipeptidase	61
Foto 4 - Alótipos de C4A e C4B observados após eletroforese prolongada seguida de imunofixação, utilizando-se soros tratados com neuraminidase e carboxipeptidase	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos alótipos de C3 nos pacientes chagásicos forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	70
Gráfico 2 - Distribuição dos alótipos de BF nos pacientes chagásicos forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da distribuição alotípica de C3 entre pacientes com Chagas forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	56
Tabela 2 - Comparação da distribuição alotípica de C3 entre pacientes com Chagas forma cardíaca e forma indeterminada	57
Tabela 3 - Comparação da distribuição alotípica de BF entre pacientes com Chagas forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	59
Tabela 4 - Comparação da distribuição alotípica de BF entre pacientes com Chagas forma cardíaca e forma indeterminada	63
Tabela 5 - Comparação da distribuição alotípica de C2 entre pacientes com Chagas forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	64
Tabela 6 - Comparação da distribuição alotípica de C2 entre pacientes com Chagas forma cardíaca e forma indeterminada	65
Tabela 7 - Comparação da distribuição de alguns alótipos de C4B entre pacientes com Chagas forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles ..	66
Tabela 8 - Comparação da distribuição de alguns alótipos de C4B entre pacientes com Chagas forma cardíaca e forma indeterminada	67

Tabela 9 - Frequências gênicas de C3, BF e C2 em pacientes chagásicos forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	68
---	----

Tabela 10 - Frequências gênicas de C4A e C4B em pacientes chagásicos forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles	69
--	----

RESUMO

A participação do Sistema Complemento na imunopatologia da Doença de Chagas é algo já definido. Considerando-se que a Doença de Chagas pode apresentar-se de forma bastante polimórfica, o presente trabalho teve como objetivo estudar a susceptibilidade ou resistência genética conferida pelo complemento em pacientes chagásicos. Para tanto, determinamos o polimorfismo genético de C2, C3, BF, C4A e C4B numa população de 100 pacientes chagásicos, sendo 57% da "forma cardíaca" e 43% da "forma indeterminada". Como controles foram estudados indivíduos adultos normais, pareados com a máxima proximidade possível com a amostra dos pacientes, segundo o grupo étnico, sexo, idade e origem geográfica. A idade média dos pacientes chagásicos como um todo foi de 41 anos, sendo que os chagásicos considerados como "forma indeterminada" apresentaram uma idade média de 38 anos e os de "forma cardíaca" de 44 anos. A idade média dos pacientes que foram a óbito durante a realização do estudo (4%) foi de 38 anos. 65% dos pacientes chagásicos eram do sexo masculino, sendo que entre eles 36 (55,38%) tinham forma cardíaca e 29 (44,62%) forma indeterminada. Os pacientes restantes (35%) eram do sexo feminino e entre eles 21 (60%) tinham forma cardíaca e 14 (40%) forma indeterminada. Considerando o grupo étnico, 5% dos pacientes chagásicos eram brancos europeus, 49% brancos brasileiros, 44% mulatos e 2% negros. Dos pacientes com forma cardíaca 48 (83,22%) eram do Norte do Paraná e 34 (79,06%) com forma indeterminada tinham a mesma procedência. O tempo médio entre a possível época de infecção com o *T. cruzi* e a realização do estudo foi de 36 anos nos chagásicos forma cardíaca e de 30 anos nos chagásicos forma indeterminada. A idade média dos controles foi de 34 anos, sendo 68% do sexo masculino e 32% do sexo feminino. Considerando o grupo étnico, 5% dos controles eram brancos europeus, 49% brancos brasileiros, 44% mulatos e 2% negros. Todos os controles eram do Paraná. As variantes polimórficas de BF, C3 e C4 foram detectadas através de eletroforese em gel de agarose, sob alta voltagem e refrigeração contínua. BF e C4 foram visualizados após imunofixação. Na determinação das variantes de C2 foi empregado o método de focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, seguida de teste hemolítico. Os resultados demonstraram uma associação positiva do alótipo C3 F nos pacientes chagásicos com forma cardíaca quando comparados com os controles ($p = 0,0494$) e pacientes com forma indeterminada ($p = 0,008$). Após correção para o número de alelos testados a associação positiva de C3 F persiste apenas quando os pacientes chagásicos forma cardíaca foram comparados com os de forma indeterminada ($p = 0,016$), o que sugere este

alelo como marcador de susceptibilidade para a evolução de forma cardíaca da Doença de Chagas. O alótipo BF S apresentou uma associação negativa com os pacientes chagásicos de forma cardíaca ($p = 0,0143$) e com o grupo de Chagas total ($p = 0,0233$), quando comparados com os controles. Considerando a correção para o número de alelos testados a associação negativa de BF S persiste apenas quando os pacientes chagásicos forma cardíaca eram comparados com os controles ($p = 0,0429$), o que sugere que indivíduos portadores deste alótipo apresentam uma maior resistência contra o desenvolvimento da Doença de Chagas na sua forma cardíaca de evolução. A análise da distribuição dos alelos de C2, C4A e C4B não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados o que corrobora a importância da via alternativa do complemento nos mecanismos de defesa contra o *T.cruzi*. Os resultados obtidos sugerem um papel imunogenético da via alternativa do complemento na Doença de Chagas, influenciando a forma clínica de evolução dos pacientes chagásicos.

INTRODUÇÃO

1 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é composto de aproximadamente 20 diferentes glicoproteínas que circulam nos compartimentos do fluido extracelular, além de uma série de outras proteínas que são constituintes da membrana celular. As proteínas da via clássica são designadas pela letra C seguida de um número (C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 e C9) de acordo com a ordem de sua descoberta ou identificação. As proteínas da via alternativa e de função reguladora são designadas por nomes: Fator B (BF), Fator D, Properdina (P), inibidor da C1 esterase (C1-INH), proteína que se liga a C4 (C4-bp), fator H (H) e fator I (I). Existem também algumas glicoproteínas de superfície celular denominadas de proteínas reguladoras de membrana, entre as quais estão incluídos os receptores do complemento como CR1 (receptor para C3b), o fator acelerador da degradação (DAF) e o fator de restrição homóloga (KIPNIS; DIAS DA SILVA, 1989).

As proteínas do sistema complemento, quando funcionam em ordem e de forma integrada, atuam como importantes mediadores da defesa do hospedeiro e das reações inflamatórias. Sua ativação constitui-se de um importante mecanismo de resistência contra a invasão de microorganismos porém, quando exacerbada, pode ser prejudicial ao organismo levando a efeitos deletérios como aos observados nas reações por meio de

contraste, circulação extracorpórea e doenças autoimunes (FEARON; AUSTEN, 1979).

A ativação do sistema complemento pode ocorrer pela via clássica envolvendo C1, C4, C2 ou pela via alternativa envolvendo o fator B, C3, fator D e properdina.

1.1 VIAS DE ATIVAÇÃO

1.1.1 Via Clássica

A via clássica é geralmente ativada pela interação de um anticorpo de classe ou subclasse apropriada (IgG1, IgG2, IgG3, e IgM) com um antígeno de superfície celular. Este complexo imune liga-se a C1 através da região Fc da imunoglobulina, ativando-o. C1 na realidade é um complexo macromolecular composto de três subunidades designadas C1q, C1r, C1s, ligadas por íons cálcio.

A ativação de C1 parece requerer pelo menos dois pares de cadeias pesadas de imunoglobulinas que apresentam um arranjo espacial propício para expor os fragmentos Fc, os quais se ligam a C1q. Após sua ligação com a imunoglobulina, C1q adquire mudanças na sua conformação que ativa C1r e C1s. Após a formação de C1s ativado (C1s⁺), a reação continua com C4 formando um complexo intermediário C1-4. Tem sido demonstrado que C1s⁺ atua sobre as moléculas de C4 de duas formas: criando as condições necessárias para a ligação de C4 com a membrana celular ou com complexo antígeno-anticorpo, e preparando C4 para sua ligação com C2. Após a ativação das moléculas de C4, através de C1, estas são clivadas em um fragmento menor (C4a) e um fragmento maior (C4b), este último liga-se à superfície da membrana celular. O fragmento maior contém os locais de ligação para as moléculas de C2.

As moléculas de C2 se ligam reversivelmente a C4b e numa segunda fase C1 \bar{s} cliva estas moléculas de C2 produzindo dois fragmentos: C2a, fragmento ativo que se liga firmemente porém não irreversivelmente a C4b, e C2b, fragmento inativo o qual se dissocia na fase fluida. O fragmento C2a contém os locais ativos da esterase sérica do complexo C4b2a, uma enzima denominada de C3 convertase da via clássica. O complexo C4bC2a é instável, com uma vida média de aproximadamente 12 minutos a 32 °C. Este fenômeno é referido como "decay" (KIPNIS; DIAS DA SILVA, 1989).

Após a ativação do C3 pela C3 convertase, estas moléculas são clivadas em um fragmento maior (C3b) e um fragmento menor, C3a, que é liberado na fase líquida. C3b liga-se imediatamente à membrana e forma o complexo C4b2a3b (C5 convertase). Se as moléculas C3b não se ligam rapidamente a superfícies ativadoras, elas perdem sua atividade e são convertidas para sua forma inativa (iC3b), através da ação dos cofatores H, I e do fator acelerador de degradação (DAF).

O C3b do complexo C5 convertase apresenta o substrato C5 na forma apropriada para a clivagem, e C2a carrega o local ativo da enzima. Após C5 ter sido clivado, o complexo C5b-C9 é formado. O complexo C5b-9 é denominado de complexo lítico de membrana (CLM) por induzir a lise de membranas celulares.

1.1.2 Via Alternativa

A via alternativa atua como um mecanismo primário de defesa no hospedeiro, contra uma variedade de organismos patogênicos. Algumas das proteínas que participam da ativação desta via são: C3, Properdina (P), fator B (B), fator D (convertase proativadora de C3), fator I, fator H, algumas

glicoproteínas da superfície celular com o receptor de C3b (CR1), fator acelerador de degradação (DAF) e provavelmente outros componentes de superfície celular ricos em ácido siálico (KIPNIS; DIAS DA SILVA, 1989).

Na via alternativa, a ativação de C3 até C9 é iniciada de forma diferente do que na via clássica. A C3 convertase da via alternativa difere da C3 convertase da via clássica (C4b2a). Na via alternativa, a C3 convertase é constituída do produto maior da clivagem de C3 (C3b) e do produto maior da clivagem do fator B (Bb).

O componente Bb da C3 convertase da via alternativa é gerado através da clivagem enzimática do fator B nativo pelo fator D. O fragmento C3b da C3 convertase pode ser gerado através de pelo menos dois diferentes mecanismos: a partir do C3 nativo pela ação da C3 convertase da via clássica, e, independentemente da via clássica, pela ação de uma C3 convertase relativamente ineficiente produzida na fase fluida pela interação de C3 nativo, fator B nativo e fator D. Porém, se o C3b assim gerado fixa-se numa superfície apropriada, como a superfície de um glóbulo vermelho ou de uma bactéria, e se combina com Bb, ele tem o potencial de formar uma partícula eficiente da enzima C3 convertase da via alternativa. Esta C3 convertase é muito lábil e a temperatura fisiológica rapidamente é degradada. Duas proteínas plasmáticas têm-se mostrado como estabilizadoras desta C3 convertase. Uma delas é a properdina, constituinte normal do plasma; a outra proteína é um auto-anticorpo (IgG), chamado fator nefrítico C3 Nel, o qual é dirigido contra o complexo C3bBb e tem sido detectado em alguns pacientes com glomerulonefrite membranoproliferativa com lipodistrofia parcial (FEARON; AUSTEN, 1979). Por outro lado, o

fator acelerador de degradação (DAF) acelera a degradação da C3 convertase.

Duas outras proteínas, fator I e fator H, inibem a geração ou expressão da enzima C3 convertase. O fator H não somente compete com B pela ligação com C3b na formação da C3 convertase da via alternativa, como também pode deslocar Bb do complexo C3bBb já formado. O fator I inibe a C3 convertase da via alternativa pela inativação do C3b ligado à célula através de sua clivagem proteolítica. O nível de inativação de C3b é marcadamente acelerado pelo fator H.

As partículas capazes de ativar a via alternativa o fazem, em parte, pela sua habilidade de ligar-se ao C3b e proteger o complexo C3bBb da ação dos fatores H e I.

Pelo menos um mecanismo pelo qual partículas podem proteger a C3 convertase da via alternativa da ação dessas duas proteínas reguladoras, foi elucidado. Partículas com altos níveis de ácido siálico sobre sua superfície são ativadores fracos da via alternativa, enquanto partículas com baixos níveis de ácido siálico são bons ativadores (FEARON, 1978).

Dois pontos devem ser salientados quando se fala da via clássica e via alternativa. Em primeiro lugar a formação de C3b através da via clássica pode levar à ativação da via alternativa. Em segundo lugar, devido ao fato de C3b ser ao mesmo tempo produto da ação da C3 convertase da via alternativa e também elemento que faz parte da composição da mesma, a ativação de C3 pela via alternativa tem o potencial de ser autocatalítico.

A formação da C5 convertase é essencial para a geração do CLM C5b-C9. Evidências obtidas indicam que a C5 convertase

da via alternativa é o complexo C3bBP com moléculas C3b adicionais. Uma vez que o C5 é clivado, o complexo C5b-C9 é formado e insere-se na membrana celular provocando a lise (KOLB; MÜLLER-EBERHARD, 1973).

1.1.3 Via Efetora Final

A ativação de ambas as vias clássica e alternativa do complemento leva à formação do complexo final de ativação constituído de C5b, C6, C7, C8 e de moléculas de C9 polimerizadas, o qual apresenta-se como uma estrutura cilíndrica quando examinado pela microscopia eletrônica, e aparentemente possui um canal central hidrofílico e uma superfície externa hidrofóbica, além de numerosos fragmentos pequenos. O CLM, uma vez inserido na membrana celular, forma poros interferindo na estabilidade osmótica das células, provocando intumescência e lise das mesmas (KOLB; MÜLLER-EBERHARD, 1973).

Na Figura 1 observamos a sequência da ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento (EICHENFIELD; JONSTON, 1989).

1.1.4 Receptores do Complemento

Alguns componentes do complemento ou seus fragmentos (C1q, C4a, C4b, C3a, C3b, iC3b, C3d, C3e, C5a, C5b, H) interagem com receptores de membrana presentes nos eritrócitos, todos os tipos de leucócitos, plaquetas, células do rim, fibroblastos e macrófagos; são os denominados receptores do complemento que fazem parte das proteínas reguladoras de membrana do sistema complemento. Somente os receptores para

C3b, iC3b, C3d e H foram até o momento isolados. Para os outros componentes, as estruturas receptoras têm sido aceitas devido às reações de ligação e seus conseqüentes fenômenos biológicos (DIERICH, 1988). É através destes receptores que os componentes do complemento ou seus fragmentos, participam na regulação da resposta imune que envolve linfócitos B, linfócitos T, macrófagos, fibroblastos, granulócitos, monócitos, mastócitos, entre outros.

No Quadro 1 são apresentadas algumas características destes receptores.

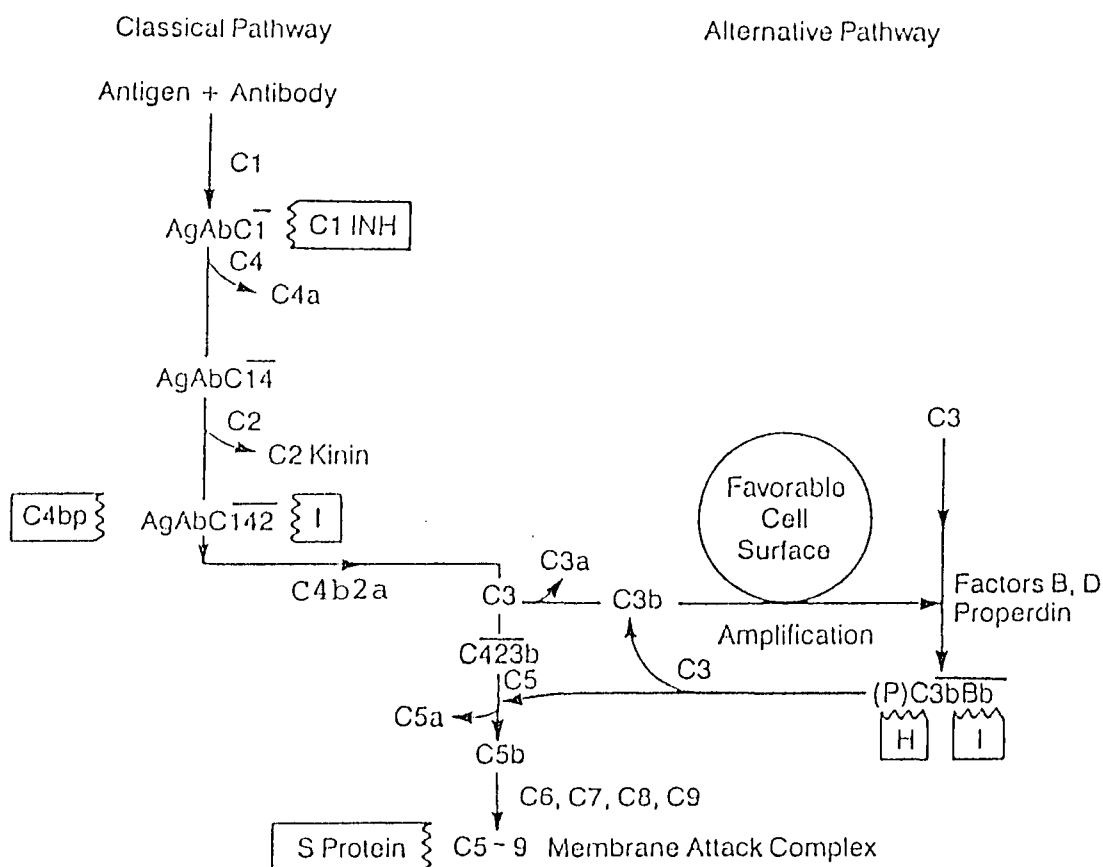


Figura 1 - Sequência da ativação das vias clássica e alternativa do Sistema Complemento (EICHENFIELD; JONSTON, 1989).

QUADRO 1 - RECEPTORES DO COMPLEMENTO (MAUFF, 1985)

Receptor	Fragmentos de Ligação	Célula Carregadora do Receptor
CR1 (CD35)	C3b, iC3b, C4b	Monócito/Macrófago Eritrócito, Granulócito, Linfócitos T, Linfócitos B, Célula K, Podócito glomerular
CR2 (CD21)	C3dg, C3d (iC3b)	Linfócitos B, Célula K, Células dendríticas foliculares
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b	Monócitos/Macrófagos, Granulócitos, (Linfócitos T), Célula K
CR4 (CD11C/CD18)	iC3b (C3dg)	Monócitos, Macrófagos Granulócitos, Célula K
Receptor de C3a	C3a, C4a	Mastócitos, Granulócitos, Trombócitos, Monócitos/Macrófagos, Musculatura lisa, (linfócitos T?)
Receptor de C5a	C5a, C5a sem arginina	Monócitos, Macrófagos, Granulócitos, Mastócitos, Trombócitos, Musculatura lisa
Receptor de C1q	C1q	Granulócitos, Monócitos, Trombócitos, Linfócitos B(T), Fibroblastos
Receptor H?	Hn	Monócitos, Macrófagos, Linfócitos B

1.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO COMPLEMENTO

Além da formação do complexo lítico de membrana, que produz a lise osmótica de células-alvo, quando as moléculas de C3 até C9 são ativadas pela via clássica ou alternativa, elas produzem produtos biologicamente ativos que são importantes na geração da resposta inflamatória e na defesa do hospedeiro contra infecções.

1.2.1 Opsonização e Fagocitose

A geração de fragmentos C3b, que adere a partículas-alvo, é a principal função biológica do complemento. Receptores para C3b estão presentes em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células de Kupffer, macrófagos alveolares, glóbulos vermelhos de primatas, plaquetas de muitas espécies não primatas e linfócitos B (DIERICH, 1988).

C3b que está recobrindo as partículas-alvo adere avidamente às células fagocíticas através dos receptores CR1, promovendo imunoaderência.

Uma vez que a maioria das células efectoras não possuem receptores para IgM, a fixação de C3b nas partículas alvo é provavelmente um evento opsonizante crítico durante a fase inicial da produção de IgM na resposta imune primária. Posteriormente, a imunoglobulina IgG aparece e aumenta o efeito opsonizante de C3b através dos receptores Fc.

O C4b que recobre células-alvo atua similarmente a C3b, porém com menos eficácia.

1.2.2 Lesão de Membrana Celular

Células-alvo como bactérias Gram negativas e outras, na presença de anticorpo específico, ou diretamente, podem ativar o sistema complemento e sofrer lesões de membrana. Os componentes de C5-C9 são os responsáveis pelo desencadeamento desta lesão através da formação do CLM que leva à lise osmótica das células-alvo (KOLB; MÜLLER-EBERHARD, 1973).

**QUADRO 2 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPONENTES DO SISTEMA
COMPLEMENTO (MAUFF, 1985)**

Atividade	Componente
Liberação de substâncias vasoativas de mastócitos/basófilos	C5a, C3a, (C2b)
Contração da musculatura lisa	C5a, C3a, C4a
Mobilização de leucócitos	C3e
Quimiotaxia	C5a
Opsonização	C3b, C4b
Agregação e aderência de granulócitos	C5a
Liberação de enzimas lisossômiais de leucócitos	C5a, (C3a?)
Ativação do metabolismo do ácido aracdônico	C5a, C3a, C3b, C5b-9
Liberação de monocinas (IL-1, TNF α)	C5a, C5b-9, (C3a)
Produção de radicais de oxigênio	C5a, Bb, C5b-9
Lise de membrana	C5b-9
Agregação de plaquetas	C5a, C3a
Inibição da precipitação de imunocomplexos	C1, C4, C2
Solubilização de imunocomplexos	C3b
Estimulação da síntese de anticorpos	C5a
Inibição da síntese de anticorpos	C3a

1.2.3 Formação de Anafilotoxinas

A ativação de C3 e C5 resulta na clivagem dessas moléculas em dois fragmentos de diferentes tamanhos. Os fragmentos menores (C3a e C5a) possuem atividade de anafilotoxinas pela sua capacidade de liberar histamina a partir dos mastócitos, contraindo a musculatura lisa e

promovendo o aumento da permeabilidade capilar. Esta última função é de especial importância na resposta inflamatória inicial do hospedeiro, já que promove a passagem de proteínas séricas do compartimento vascular para o extravascular.

C3a, apesar de ser menos potente, que C5a, é produzido numa quantidade 15 vezes maior que C5a contrastando sua menor atividade intrínseca através de suas concentrações maiores.

C4a, gerado a partir da ativação de C4, também possui função de anafilatoxina. A eficiência biológica dos 3 peptídeos com funções de anafilatoxina (C3a, C4a, C5a) é como segue C5a > C3a > C4a.

1.2.4 Quimiotaxia

Quimiotaxia ou movimento direcionado é uma reação pela qual a locomoção de células ou de organismos é determinada por substâncias (fatores quimiotáticos) no seu meio.

C5a é o principal fator quimiotático para polimorfonucleares e monócitos. Ele atrai estas células fagocíticas para os locais de inflamação provocando a marginalização das mesmas nos vasos sangüíneos com consequente neutropenia.

Além do C5a, o fragmento C3a e o complexo macromolecular C5b,6,7 possuem atividade quimiotática (LACHMANN, 1970).

1.2.5 Indução da Resposta Humoral

Duas evidências levaram a aceitar este conceito: demonstração de receptores para componentes do complemento em linfócitos e fagócitos mononucleares, e, dois dos 3 maiores receptores do complemento (CR), descritos em uma variedade de tipos celulares, ocorrem em linfócitos B: CR1 (que liga C3b e iC3b) e CR2 (específico para C3d, C3dg iC3b).

DUKOR; HARTMANN (1973) propuseram que C3b se liga a seus receptores liberando um sinal deflagrador não específico para as células B.

Por outro lado, PEPYS (1974) sugere que C3 é necessário para a cooperação celular na indução de resposta humoral T dependente. Esta idéia foi confirmada através de estudos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram que anticorpos anti-C3 inibem a resposta humoral T dependente, porém não o fazem para T independente (FELDMANN; PEPYS, 1974).

Foi observado também que C5a purificado é mitogênico para linfócitos humanos e que aumenta a resposta de anticorpos *in vitro*. Existe evidência de que vários componentes do complemento são expressos na superfície de linfócitos e fagócitos mononucleares, e SUNDSMO (1982) sugeriu que este sistema complemento-leucócito (C5, C5a e/ou C6 e C7) pode estar envolvido na ativação linfocítica.

1.2.6 Solubilização de Imunocomplexos

O sistema complemento tem a capacidade de induzir a solubilização dos complexos imunes circulantes ou depositados em tecidos. A via clássica inibe a formação de complexos imunes precipitantes no plasma e a via alternativa solubiliza os complexos pré-formados e depositados em tecidos. Esta atividade ocorre pela ação principalmente de C3b e C4b, que uma vez ligados aos complexos imunes, induzem a ruptura da malha de precipitação, rompendo os agregados e aumentando a sua solubilização. Este evento é de fundamental importância para uma eliminação eficiente dos complexos imunes formados *in vivo* (FEARON; AUSTEN, 1979).

No Quadro 2 podem ser observadas as atividades biológicas dos diferentes fragmentos formados durante a ativação do sistema complemento.

1.3. POLIMORFISMO GENÉTICO DO SISTEMA COMPLEMENTO

O polimorfismo de proteínas é observado em vários sistemas, incluindo o sistema do complemento. Polimorfismo foi definido por FORD (1940) como sendo "a ocorrência concomitante no mesmo habitat de duas ou mais formas ou 'fases' de uma espécie em tais proporções que a mais rara delas não pode ser mantida apenas por mutação recorrente".

O polimorfismo é uma característica determinada geneticamente. É dito que os componentes do complemento exibem polimorfismo quando ocorrem em mais do que uma forma reconhecível. Esta característica deve ser o produto de um locus gênico com dois ou mais alelos cada um dos quais ocorrendo com uma frequência de 1% ou mais na população. Por definição, alelos polimórficos são codominantes, já que o produto de cada um deles pode ser identificado. Praticamente quase todos os componentes do complemento apresentam um polimorfismo determinado geneticamente. Para alguns componentes como C4, o grau de polimorfismo é extremamente alto e de ordem similar ao encontrado nos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (CPH). O polimorfismo proteico pode ser resultado de uma mutação que provoca uma ou mais substituições de aminoácidos ou deleção na cadeia polipeptídica, o que pode causar pequena ou nenhuma mudança na função da proteína e desta forma o polimorfismo é propagado dentro da população. Porém, dependendo da substituição ou do tamanho da deleção do DNA, a proteína pode ser alterada ao ponto de afetar sua função e, em

alguns casos, ser letal ou provocar alterações patológicas (HARRIS, 1980).

Alguns componentes do complemento como C4, C3, C5 e C8 estão constituídos por 2 ou mais cadeias polipeptídicas. Na realidade, estes componentes seriam sintetizados como uma molécula precursora de uma única cadeia polipeptídica a qual seria clivada posteriormente. Desta forma, apesar de um único *locus* estrutural estar envolvido na síntese, outros *loci* estão certamente envolvidos nas modificações enzimáticas pós-translacionais do precursor proteico, este fato pode conseqüentemente determinar polimorfismo estrutural da proteína secretada (HARRIS, 1980).

Outras das modificações pós-transdução que produzem diferenças estruturais numa proteína, é a glicosilação. Os componentes do complemento são glicoproteínas e são modificados pós-transdução por transferases controladas por genes diferentes daqueles genes estruturais. A extensão da glicosilação de uma proteína pode afetar consideravelmente a migração eletroforética, podendo ser a causa de polimorfismo proteico. O polimorfismo dos componentes do complemento pode ser reconhecido por alterações no peso molecular, mobilidade eletroforética, ponto isoelétrico, atividade sorológica ou atividade funcional (MAUFF, 1985).

Também podem ocorrer diferenças quantitativas como deficiências parciais ou completas de certos componentes, como é o caso de C2 e C4.

Alguns alelos de certos componentes (especialmente C2, C3, C4 e BF) estão associados com um aumento do risco de desenvolvimento de doenças auto-imunes e infecciosas (MAUFF,

1985). Os diferentes alelos podem apresentar diferenças quanto às suas funções, o que poderia em parte explicar a sua associação com doenças.

1.3.1 Fator B (BF)

O fator B é constituído por uma cadeia polipeptídica única de peso molecular aproximado em 90.000. É clivado durante sua ativação num fragmento maior (Bb) com peso molecular de 60.000 e num fragmento menor (Ba) com peso molecular de 30.000. O fator B é codificado por um único *locus* na região da classe III do CPH (Figura 2). As duas formas alélicas mais comuns de BF são designadas como BF S (slow) e BF F (fast). Na maioria dos grupos raciais BF S é a forma alélica mais comum (O'Neill et al., 1979).

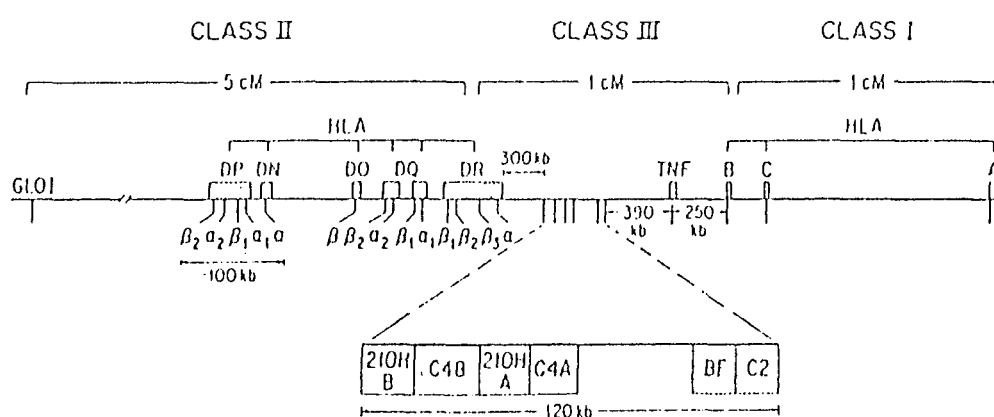


Figura 2 - O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) no cromossoma 6 (ALPER et al., 1989)

A diferença na migração eletroforética de F e S é produzida por cargas diferentes no fragmento Ba, enquanto que na de F1, S1 e na maioria das variantes raras é devida a cargas diferentes no fragmento Bb. Observam-se na Figura 3 os alótipos comuns e raros de BF (MAUFF, 1986).

Ainda não está claro se as diferentes formas estruturais da C3bBb convertase, que contém fragmentos Bb derivados de formas raras de BF como BF F1 e BF S07, têm certa relação com susceptibilidade a doenças, uma vez que algumas destas formas raras de BF, estão associadas com diabetes insulino-dependente (RAUM et al., 1979; MAUFF, 1985) e nefropatia membranosa idiopática (DYER et al., 1980).

Em contraste ao C4A, C4B e C2, a deficiência completa do fator B é extremamente rara sugerindo que a via alternativa de ativação do C3 é de maior importância biológica do que a via clássica.

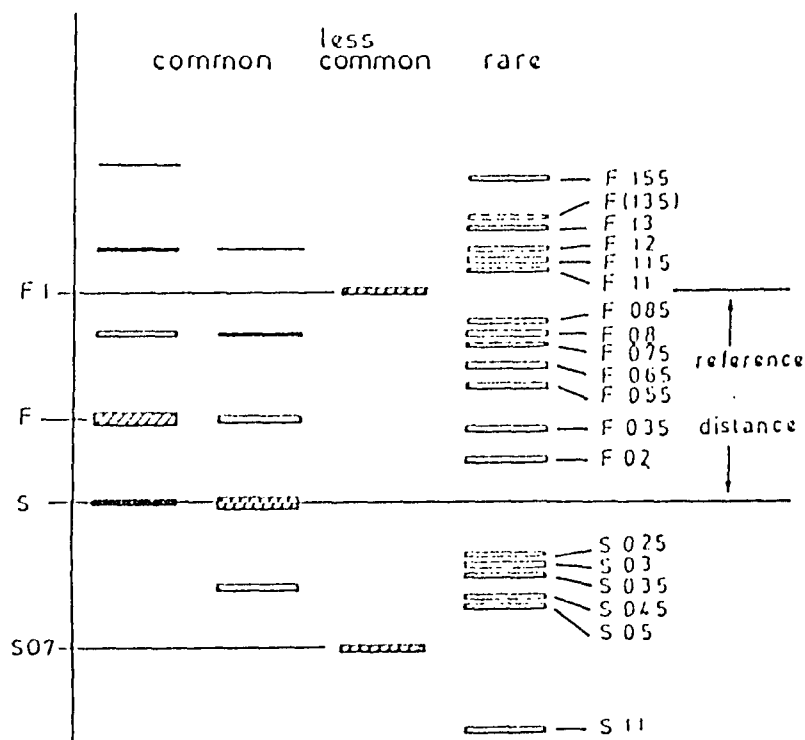


Figura 3 - Esquema dos alótipos comuns e raros de BF (MAUFF, 1986).

1.3.2 C3

C3 é sintetizado como um precursor (pró-C3) com uma cadeia polipeptídica única que é subsequentemente clivada para formar uma estrutura com 2 cadeias polipeptídicas.

C3 é o mais abundante componente do complemento presente no soro. É codificado por um único locus localizado no cromossoma 19. O fígado é a principal fonte de síntese do C3 sérico. Biosíntese extra-hepática de C3, no homem, é atribuída a monócitos e macrófagos. Nos pacientes com deficiência de C3, os monócitos são capazes de produzir 20 a 30% da síntese normal de C3 (EINSTEN et al., 1977).

Os alótipos comuns de C3 são designados como: C3 F (fast); C3 S (slow) e C3 FS para a forma comum heterozigota. Além destes alótipos de C3, existem aqueles considerados raros: C3 F1; C3 S1; C3 F05; C3 F055; C3 F06; C3 S025; C3 S04; etc. (Figura 4).

O significado biológico do grande número de variantes de C3 ainda não está bem entendido, a maioria de suas variantes, se não todas, são similares com respeito a sua eficiência na lise dependente de C3, de eritrócitos de carneiro (COLTEN; ALPER, 1972).

Por outro lado, ARVILOMMI (1974) demonstrou que os produtos resultantes da clivagem de C3 ligam-se de forma diferente a seus receptores nos monócitos, sendo esta ligação influenciada pelo fenótipo de C3. Este achado despertou o interesse no estudo do polimorfismo de C3 e sua associação com doenças.

FARHUD et al. (1972) encontraram uma frequência aumentada de C3 F na artrite reumatoide e na hepatite. Esta

variante também está aumentada em pacientes com aterosclerose (SORENSEN; DISSING, 1975) e fibrose cística (SCHLOTZ et al., 1978).

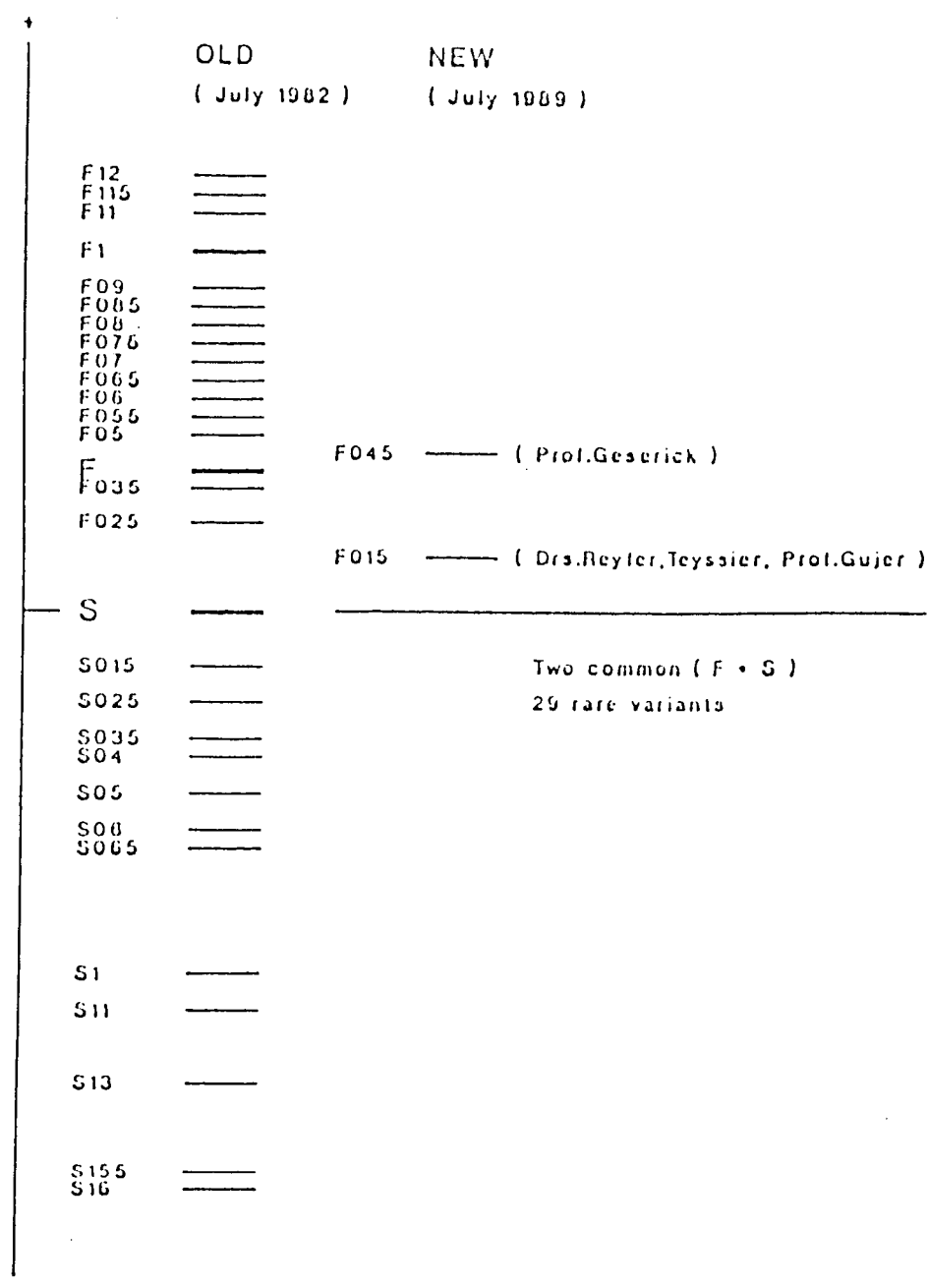


Figura 4 - Alótipos comuns e raros de C3 (RITTNER; STRADMAN-BELLINGHAUSEN, 1990)

1.3.3 C2

C2 é codificado por um único locus na região da classe III do CPH (Figura 2), localizado somente 0,5 Kb do 5' final do BF (BENTLEY e cols., 1985). C2 é funcional e estruturalmente semelhante ao BF. Devido a estas semelhanças e à extrema proximidade destes loci, tem sido sugerido que um dos loci surgiu através da duplicação do outro. Porém, considerando-se a marcada diferença no tamanho dos genes de C2 e BF, a duplicação gênica não deve ser um evento recente. O polimorfismo de C2 é muito menor do que o polimorfismo de BF. A forma mais comumente encontrada no plasma é C2 C. Uma forma mais rara é C2 B, e formas ainda mais raras como a variante C2 A são reconhecidas. Observa-se na Figura 5 uma representação esquemática do polimorfismo de C2 usando focalização isoeletrica.

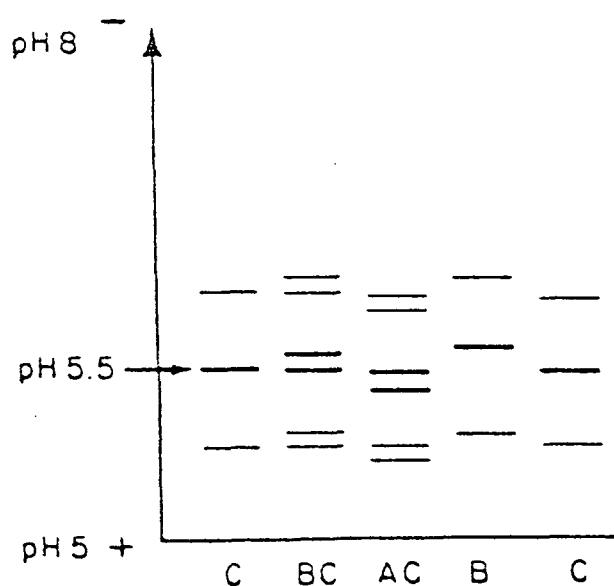


Figura 5 - Representação esquemática do polimorfismo de C2.

A deficiência de C2 é comum entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (BERTRAMS et al., 1976). O alelo nulo de C2 (C20) responsável por esta deficiência é usualmente herdado com o haplótipo HLA - A25, B18, DR2, BF S, C4A4 B2. (AGNELLO, 1978; AWDEH et al., 1981). Baixos níveis de C2 associado com este haplótipo foram inicialmente estudados na esclerose múltipla (DAY et al., 1975).

BERTRAMS et al. (1980) observaram uma associação do alelo C2 B com a retinopatia proliferativa do Diabetes Mellitus Insulino-Dependente. Porém, não deve ser desconsiderado que esta associação possa ser secundária ao HLA - DR4.

1.3.4 C4

C4 é uma glicoproteína de peso molecular de 200.000, a qual é sintetizada como um precursor (pro-C4) com uma única cadeia polipeptídica. O pro-C4 é clivado em 3 cadeias α , β , γ com peso molecular aproximado de 95.000, 78.000 e 33.000, respectivamente. C4 é codificado por 2 loci distintos, C4A e C4B, localizados na região de classe III do CPH (Figura 2). Os produtos alélicos de cada locus diferem quanto às suas propriedades funcionais. Os produtos alélicos do locus C4A ligam-se através da ligação tioéster, preferencialmente a grupos aminas, enquanto os do C4B ligam-se mais eficientemente a grupos hidroxílicos; como consequência os alelos C4B são hemoliticamente quatro vezes mais ativos do que aqueles do locus C4A. Diferenças quanto à capacidade de ligação e inibição da precipitação de complexos imunes têm sido descritas também para os diferentes alelos de C4A e C4B (SCHIFFERLI; PACCAUD, 1989).

Cada locus de C4 é altamente polimórfico e alelos nulos em cada locus ocorrem com uma frequência de aproximadamente 5 a 15%, dependendo da população. As diferenças estruturais dos diferentes produtos alélicos residem na cadeia α .

A associação dos alelos de C4 e doenças pode ser dividida em dois tipos:

a) Presença de alelos nulos de C4 (Q0) em pacientes com determinadas doenças como Lupus eritematoso sistêmico, Esclerodermia, Panencefalite esclerosante subaguda pós-sarampo, Nefropatia membranosa idiopática, Diabetes mellitus insulino-dependente e outros (MAUFF, 1985; MOLLENHAUER et al., 1984; RITTNER et al., 1984c).

Deve ser salientado que existe uma maior associação de doenças auto-imunes com alelos nulos de C4 no locus C4A (C4AQ0 do que no locus C4B (C4BQ0). C4A parece ser duas vezes mais eficiente do que C4B em restaurar a habilidade do soro humano deficiente de C4 em inibir a precipitação de imunocomplexos. Qualquer diminuição da ligação de C4 a imunocomplexos com antígenos celulares ou não celulares levaria à diminuição da ligação de C3b a imunocomplexos, provocando uma redução na solubilização pelo complemento. Desta forma, diante de uma deficiência de C4, um maior número de imunocomplexos persiste por maior tempo na circulação induzindo um aumento dos depósitos de imunoagregados particularmente em arteriolas e vênulas como o encontrado no Lupus eritematoso sistêmico (FIELDER et al., 1983).

Presença significativamente aumentada de alelos nulos de C4B (Q0) tem sido encontrada em algumas doenças

infecciosas como paracoccidioidomicose brasileira (de MESSIAS et al., 1991a); eritema nodoso hansênico (de MESSIAS et al., 1993) e meningite bacteriana (ROWE et al., 1989). Os alelos de C4B possuem uma maior atividade lítica para membranas do que os alelos de C4A (SCHIFFERLI; PACCAUD, 1989). A ausência homozigota ou heterozigota de C4B poderia favorecer o crescimento bacteriano, fúngico ou parasitário como reportado em infecções bacterianas severas (ROWE et al., 1989; BISHOF et al., 1990).

b) Presença de raros alelos de C4 em algumas doenças como: C4 B2.9 (B3) na glomerulonefrite, artrite reumatóide e diabetes mellitus insulino-dependente e C4 B2 na doença de Alzheimer (O'NEIL et al., 1982c; KAY et al., 1983; NERL et al., 1982).

Estes alelos raros podem ser encontrados como fazendo parte de um mesmo haplótipo o qual está associado ao diabetes mellitus insulino dependente e artrite reumatóide em famílias (41 do C4C). Os alelos dos 2 loci de C4 mostram desequilíbrio de ligação com alguns antígenos HLA assim como com alelos de C2 e BF. A mais estreita ligação deste tipo é a de C4 A6 com HLA-B17; B37; B27 (O'NEILL et al., 1980; TEISBERG et al., 1980). A variante C4 A6 quando herdada num haplótipo junto com HLA-B17 (TEISBERG et al., 1980) é funcionalmente inativa, porém, quando herdada no haplótipo junto com HLA-B27 (TEISBERG et al., 1980) ou HLA-B37 (O'NEILL et al., 1980) é funcionalmente ativa. Outra forte associação é a de C4 A4, B2 com deficiência de C2 (AWDEH et al., 1981a).

Os alótipos de C4A e C4B e as distâncias relativas de migração estão demonstrados na Figura 6 (MAUFF et al., 1990).

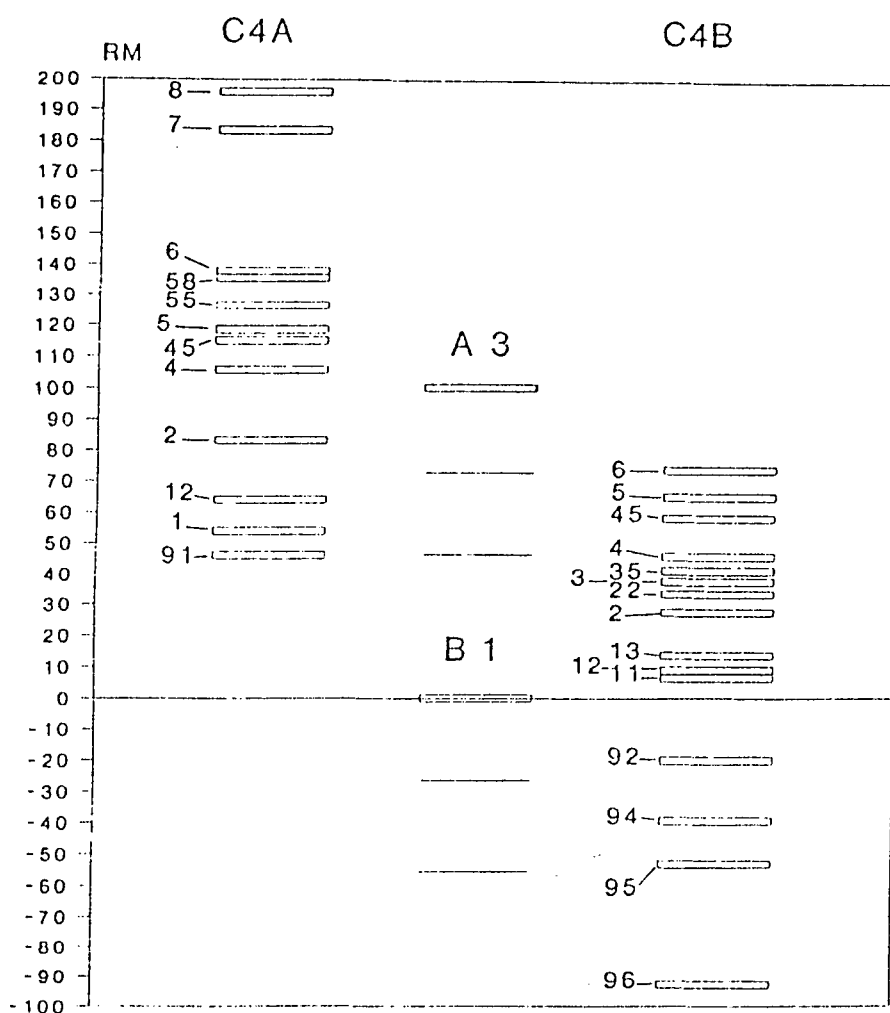


Figura 6 - Distâncias relativas de migração dos alótipos de C4A e C4B (MAUFF et al., 1990). RM = migração relativa.

1.3.5 Polimorfismo do Complemento e Doenças Associadas com HLA

Três componentes do complemento, Fator B (BF) da via alternativa de ativação; C2 e C4 da via clássica, são codificados por genes situados na região do CPH do homem, no braço curto do cromossoma 6. Estes componentes do complemento são atualmente designados como produtos gênicos da classe III do CPH.

As regiões gênicas do CPH estão divididas em 3 classes. Genes da classe I: regiões HLA - A, B e C; genes da classe II: região HLA - D/DR; e genes da classe III: os 3 componentes do complemento anteriormente mencionados (C2, Fator B, C4), os genes da 21 hidroxilase e do fator de necrose tumoral (Figura 2). Nos últimos anos vem crescendo o interesse na investigação do polimorfismo do complemento em doenças associadas com antígenos do CPH.

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) ocorre devido a uma deficiência da 21-hidroxilase. Três alelos são atualmente reconhecidas para o *locus* 21-OH: 21-OH⁰ (nulo); 21-OH^N (normal) e 21-OH^S (susceptível). Na forma clássica da doença (homozigoto para 21-OH⁰), uma associação com a variante rara de C2 (C2B) e do *locus* C4B (C4B3) têm sido observadas. Estas variantes ocorrem num haplotipo junto com HLA-Bw47 e C4AQ0 (nulo). Por outro lado, nos pacientes susceptíveis à doença (homozigotos para 21-OH^S) a variante C4 A2 é encontrada no haplótipo junto com HLA-B14; DR1.

Desta forma, dois diferentes complotipos de C4 têm sido identificados nos pacientes com hiperplasia adrenal congênita (C4 AQOB3 na forma clássica da doença e C4 A2B2 na forma assintomática), os quais se tornaram marcadores genéticos de

grande utilidade principalmente para a forma assintomática da doença (AWDEH et al., 1981b; O'NEIL et al., 1982a)

Na Artrite Reumatoide do Adulto, O'NEILL et al. (1982c) reportaram uma alta incidência de uma variante rara de C4B que lembrava aquela encontrada na hiperplasia adrenal congênita (C4 B3). Posteriormente, observou-se que esta variante de C4B podia ser diferenciada da variante C4 B3 por uma mobilidade eletroforética levemente catodal a B3 e foi designada como C4B2.9 (PERTH), ocorrendo em todos os casos do haplótipo HLA Bw62, DR4, BF S, C2 C, C4 A3 em artrite reumatóide do adulto. Inicialmente pensou-se que este haplótipo seria patognomônico da Artrite Reumatóide do Adulto, porém estudos subseqüentes mostraram uma alta freqüência do mesmo no Diabetes Mellitus Juvenil (Mc CLUSKEY et al., 1983).

No Quadro 3 estão relacionados alguns haplótipos considerados de alto risco para determinadas doenças.

1.3.6 Variedade Alotípica do Complemento e sua Associação com Doenças

Tem sido observado que algumas variantes alotípicas do complemento estão relacionadas com um risco relativamente maior de adquirir determinadas doenças, embora os mecanismos etiopatogênicos envolvidos nesta associação permaneçam ainda obscuros. A deficiência dos primeiros componentes do complemento está relacionada predominantemente com doenças auto-imunes; a deficiência de C3 e C5 com distúrbios da opsonização e fagocitose e infecções piogênicas recorrentes e a deficiência dos componentes finais do complemento com incapacidade lítica e infecções múltiplas por *Neisseria* (MAUFF, 1985).

Uma relação dos alelos de C3, BF, C4 e C2 associados com doenças está citada no Quadro 4. Uma hipótese para esta associação seria que diferentes alelos poderiam reagir de forma diferente na modulação das reações imunológicas do hospedeiro (MAUFF, 1985).

O significado dos alótipos do complemento na imunopatologia das doenças praticamente não tem sido estudado a nível molecular. Poderíamos aceitar que, a partir do reconhecimento de antígenos estranhos até a eliminação com sucesso dos mesmos, através de mecanismos efetores inespecíficos e específicos, os alótipos do complemento podem exercer uma função regulatória nas diferentes fases deste processo. A ligação de C4, C2, C3 e possivelmente do fator B (via C3) com a membrana celular ou com o complexo imune poderia representar um outro sistema de comunicação celular paralelo ao dos antígenos da classe I e II do CPH (Figura 7).

QUADRO 3 - HAPLÓTIPOS DE ALTO RISCO EM DOENÇAS (ADAPTADO DE MAUFF, 1985)

Doença	Associação com CPH	Marcador do Complemento	Risco Relativo para o marcador do Complemento	Haplótipo de Alto Risco
HAC clássica	Bw 47	C4A*00, B*3, C2*8	-	HLA-Bw47.DR7; BFF; C4A00, B3, C2C
HAC de aparecimento tardio	B14, DR1	C4A*2, B*2	-	HLA-B14; DR1; BF5; C4A2; B2; C2C
Diabete Juvenil	DR3, DR4	BF1F1, C4B*00 C4B*2.9 C4A*00	8	HLA-B18; DR3; BFF1; C4A3; B00; C2C HLA-Bw62; DR4; BFS; C4A3; B2.9; C2C HLA-B8; DR3; BFS; C4A00; B1; C2C
Artrite Reumatóide do adulto	DR4	C4B*2.9	9	HLA-Bw62; DR4; BFS; C4A3; B2.9; C2C
Lupus Eritematoso Sistêmico	DR3	C4A*00		HLA-B8; DR3; BFS; C4A00; B1; C2C
Nefropatia Membranosa Idiopática	DR3	BF1F1	16	HLA-B18; DR3; BFF1
Demência de Alzheimer	Nenhuma	C4B*2	9	C4B2 positivo

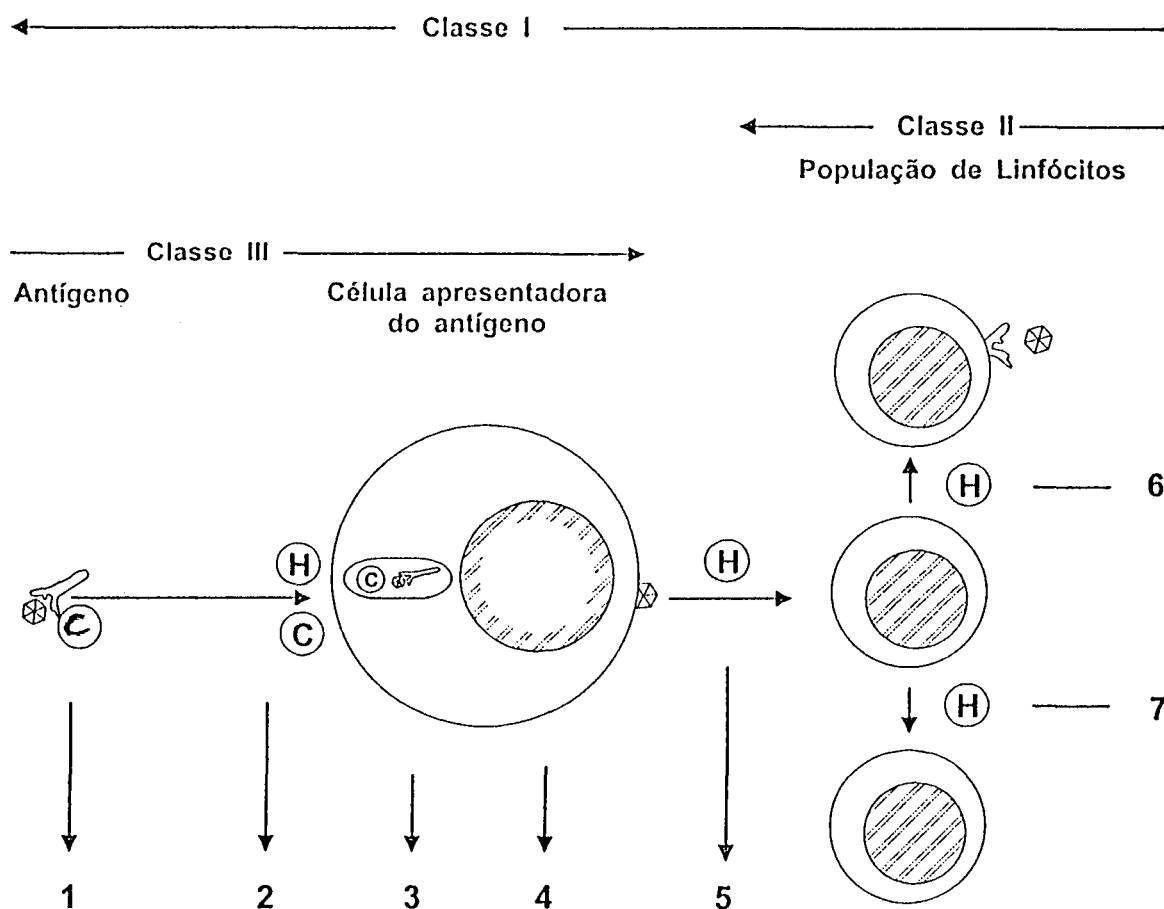


Figura 7 - Hipótese da restrição alotípica dos produtos gênicos da classe I, II e III do CPH nas reações imunológicas da defesa do hospedeiro (MAUFF, 1985).

H = antígenos da classe I (HLA-A, B, C) e classe II (HLA-D/DR); C = proteínas da classe III (C4A, C4B, BF, C2); 1 = opsonização e formação de imunocomplexos; 2 = aderência à membrana e fagocitose; 3 = morte intracelular e degradação; 4 = integração do genoma viral; 5 = apresentação do antígeno; 6 e 7 = sistemas efetores de células T.

QUADRO 4 - ALELOS DE C3, BF, C4 E C2 ASSOCIADOS COM DOENÇAS

Alelo	Doenças	Referências
C3*F	Artrite reumatóide Fibrose cística Doença vascular arteriosclerótica	BRONNENSTAM, 1973 SCHLOTZ et al., 1978 DISSING et al., 1972
BF*F1	Glomerulonefrite membranosa Diabetes melitus tipo I Lepra lepromatosa (negros) Eritema nodoso hansênico	DYER et al., 1980 RAUM et al., 1979 GREINER et al., 1980 de MESSIAS et al., 1993
BF*F075	Diabetes melitus tipo I	MAUFF, 1985
BF*F	Neurite óptica Síndrome nefrótica idiopática	FIELDER et al., 1981 McLEAN et al., 1983
BF*S	Espondilite anquilosante Artrite reumatóide	MIGONE et al., 1978 DYER et al., 1984
BF*SF	Doença celíaca Artrite reumatóide	OWEN et al., 1980 WARLOW et al., 1985
BF*S07	Lepra lepromatosa	GREINER et al., 1980
C4A*Q0	Lupus eritematoso sistêmico Síndrome lupus-like Panencefalite esclerosante subaguda Diabetes melitus tipo I Hiperplasia adrenal congênita Artrite reumatóide	FIELDER et al., 1983 HAUPTMANN, 1974 RITTNER et al., 1984c MAUFF, 1985 FLEISCHNICK et al., 1983 TAKEUCHI et al., 1989
C4*A4	Esclerose múltipla	SCHROEDER et al., 1983
C4*A6	Lepra lepromatosa	GREINER et al., 1980
C4B*Q0	Lupus eritematoso sistêmico Lupus discóide Escleroderma Artrite reumatóide Hiperplasia adrenal congênita Nefropatia membranosa idiopática Meningite bacteriana Bacteremia por encapsulados Paracoccidiodomicose brasileira Eritema nodoso hansênico	FIELDER et al., 1983 AGNELLO, 1983 MOLLENHAUER et al., 1984 SANDERS et al., 1988 FLEISCHNICK et al., 1983 MAUFF, 1985 ROWE et al., 1989 BISHOP et al., 1990 de MESSIAS et al., 1991a de MESSIAS et al., 1993
C4*B2	Doença de Alzheimer Artrite reumatóide	NERL et al., 1982 SANDERS et al., 1988
C4*B3	Artrite reumatóide Diabetes melitus tipo I Glomerulonefrite membranoproliferativa	O'NEIL et al., 1982c KAY et al., 1983 WANK et al., 1984
C4*B5	Artrite reumatóide	TAKEUCHI et al., 1989
C2Q0	Lupus eritematoso sistêmico Esclerose múltipla	DAY et al., 1975 BERTRAMS et al., 1976
C2B(2)	Retinopatia proliferativa no diabete melitus insulino dependente	BERTRAMS et al., 1980

2 DOENÇA DE CHAGAS

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi* e as formas encontradas no seu ciclo evolutivo são: amastigotas, nas células parasitadas (musculares lisas, estriadas, cardíacas e nervosas); tripomastigotas, no sangue circulante e nas fezes do triatomíneo (tripomastigota metacíclico) e epimastigotas, no intestino médio e posterior dos triatomíneos.

A doença de Chagas tem ampla distribuição por todo o continente americano, desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina. Na América do Sul, principalmente Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Venezuela, esta moléstia constitui um grave e alarmante problema de Saúde Pública, dada a sua difusão por extensas áreas. No Brasil, os estados que apresentam maiores áreas endêmicas são: Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul. Fora das Américas nenhum caso agudo de infecção humana pelo *T. cruzi* foi relatado até o presente momento, embora tenha sido constatada a infecção natural em macacos oriundos da Ásia. Existem no Brasil aproximadamente 6 milhões de chagásicos. Na América Latina, calcula-se que a endemia acomete mais de 10 milhões de pessoas. Acredita-se que 20% dos indivíduos das áreas endêmicas estão infectados pelo *T. cruzi*. Isto é de extrema importância e gravidade, pois custa ao país numerosas e preciosas vidas humanas, além de dispendiosos gastos financeiros (MECKERT et al., 1991).

2.1 FORMAS CLÍNICAS DO DOENÇA DE CHAGAS

Desde os trabalhos iniciais, Carlos Chagas (1911) dividiu a tripanosomose americana em duas fases evolutivas: aguda e crônica.

2.1.1 Forma Aguda

Caracteriza-se pela relativa facilidade com que se evidencia o *T. cruzi* no sangue periférico. É mais comum em região endêmica. A sintomatologia não raro se apresenta frusta ou fugaz chegando a passar despercebida.

2.1.2 Forma Crônica

Mais de 90% dos pacientes com manifestações clínicas da fase aguda sobrevivem à infecção inicial (LARANJA et al., 1956). Pouco a pouco os parasitas escasseiam no sangue periférico, a sintomatologia se atenua e, após algum tempo, em média 2 a 4 meses, a doença entra em período de latência clínica e torna-se crônica (CANÇADO, 1968). A literatura considera as seguintes formas crônicas de Chagas:

2.1.2.1 Forma Indeterminada

É hoje definida como a condição na qual os seus portadores apresentam reações sorológicas positivas, sem manifestações clínicas de comprometimento cardíaco ou digestivo, apresentando ainda avaliações eletrocardiográfica e radiológica do coração e aparelho digestivo normais.

A prevalência da forma indeterminada é muito elevada, atingindo em áreas endêmicas cerca da metade dos indivíduos infectados (Macedo, 1980). O mesmo autor tomando como base os da-

dos preliminares do Inquérito Sorológico Nacional sobre Doença de Chagas no Brasil, previu que existem aproximadamente 3 milhões de pacientes nesta forma. Cerca de 40% desse contingente encontra-se na faixa etária compreendida entre os 20-40 anos, portanto ela é mais freqüente entre pessoas ainda jovens.

Nos últimos anos, observa-se interesse crescente no seu estudo, e este, com a utilização de exames complementares mais sofisticados, vem demonstrando a presença de anomalias cardíacas e digestivas, na maioria dos casos.

PEREIRA-BARRETO (1985) estudando pacientes na forma indeterminada, utilizou a vetocardiografia, ecocardiografia uni e bidimensional, ventriculografia radioisotópica, mapeamento cardíaco com pirofostato de tecnecio, eletrocardiografia dinâmica e teste de esforço e constatou, analisando os processos individualmente, que um percentual variável de pessoas avaliadas tinha alterações nos vários exames complementares utilizados. Quando analisados de maneira conjunta, a maioria dos pacientes (63,6%) apresentava mais do que 3 exames complementares alterados. Este trabalho junto com o de outros autores (GIORGI et al., 1985; CUNHA, 1992) permite concluir que, sistematicamente, na forma indeterminada há algum comprometimento cardíaco e esofágico. É certo também que todos os distúrbios detectados sempre foram de pequena magnitude, de tal modo que é lícito afirmar que esse perfil afigura-se pouco acentuado e tem aspectos polimórficos, exteriorizados tão-somente através de múltiplos métodos não invasivos e invasivos (PEREIRA-BARRETO; AMATO NETO, 1986).

Todas estas novas constatações obtidas com o estudo mais aprofundado dos pacientes com forma indeterminada não

mudam o prognóstico que vem se demonstrando benigno (MACEDO, 1980). Os estudos de sobrevida dos indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas mostram que na fase citada ela é semelhante à da população normal (KLOETZEL; DIAS, 1968), parecendo, portanto, que o temor da morte súbita e de insuficiência cardíaca é apanágio das etapas crônicas clássicas.

A propósito da nomenclatura, parece justa a sugestão de conceituar a forma indeterminada da doença de Chagas considerando-a, na verdade, uma condição crônica, talvez de potencial agressivo atenuado, evolução incerta e exteriorização clínica observável à propedêutica "armada" (PEREIRA BARRETO; AMATO NETO, 1986).

Os estudos longitudinais realizados até agora têm evidenciado que uma parcela variável dos portadores da forma indeterminada da doença de Chagas evolui com o passar do tempo para formas clínicas definidas e outros permanecem por toda a vida nessa fase da doença. PEREIRA et al. (1985), realizando um estudo longitudinal de 6 anos em Virgem da Lapa, MG, observaram que 44 de 76 pacientes (57,1%) permaneceram na forma clínica indeterminada durante esse período de evolução. Não foi registrado nenhum óbito atribuído à doença de Chagas em pacientes na forma indeterminada, ao exame inicial, e a maioria desses pacientes, ao evoluírem para a cardiopatia o fizeram para um grau leve a moderado. Essas observações levam a considerar, dentro do período de 6 anos, um bom prognóstico para a forma clínica indeterminada.

COURA e cols (1983), estudando 510 pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas, procedentes dos

vários Estados do Brasil e observados no Rio de Janeiro a partir de 1960, observaram uma prevalência de cardiopatia em 52,1% dos pacientes, de megas em 14,3% e da associação entre cardiopatia e megas em 10,7% e entre megaesôfago e megacolon em 10,9% dos casos. A forma indeterminada foi observada em 39,0% dos pacientes. A proporção de cardiopatia aumentou progressivamente da 1ª a 5ª décadas da vida, enquanto a dos "megas" continuou aumentando até a 7ª década, sendo que em número de casos o pico de ambas as formas ocorreu na 4ª década. Resultados semelhantes foram observados por PEREIRA et al. (1985) que encontraram no seu estudo uma progressão mais intensa da doença nos pacientes na segunda e terceira décadas de vida, essencialmente por conta da cardiopatia decrescendo com o aumento da idade, com uma discreta elevação na 6ª década, devido aos novos casos de megaesôfago.

Os fatores capazes de influenciar a evolução da doença de Chagas ainda não são completamente conhecidos. Para avaliação do paciente, o eletrocardiograma e o exame radiológico do coração e do aparelho digestivo são suficientes pois sendo eles normais estaríamos enquadrando-os na forma indeterminada, que pelo exposto, é benigna.

2.1.2.2 Forma Cardíaca

É possível selecionar os casos da forma cardíaca, de acordo com a evolução apresentada, em 4 diferentes grupos, que parecem representar formas clínicas distintas da cardiopatia, excluída a forma aguda inicial. Essas formas seriam, segundo OLIVEIRA (1958):

I - Cardiopatía Chagásica Subaguda

Incide em pacientes jovens, em geral abaixo dos 30 anos, assumindo curso clínico de extrema gravidade, levando o paciente precocemente à morte. Em curto prazo se instala insuficiência cardíaca rebelde à terapêutica habitual, e assumindo, em geral, o tipo de insuficiência cardíaca refratária, que é a causa habitual de óbito. Fenômenos trombo-embólicos podem ocorrer agravando o quadro. OLIVEIRA (1958), através do estudo de necropsia de 12 pacientes com este tipo de evolução, encontrou em 3 pacientes quadro histológico de miocardite subaguda; em 8 miocardite crônica com reativação, e em apenas 1 caso os elementos anátomo-patológicos de miocardite crônica.

PRATA (1959) também verificou que, quando a descompensação cardíaca se estabelece antes da idade de 30 anos, há tendência de o processo evoluir de modo mais grave. LARANJA et al. (1956) também classificam de cardiopatía chagásica subaguda os casos de pacientes com menos de 30 anos nos quais se instala insuficiência cardíaca de extrema gravidade e nos quais, ao exame *post-mortem*, não há predomínio de lesões fibróticas miocárdicas, e o parasita é encontrado mais facilmente.

II - Cardiopatía Chagásica Crônica com Agudização

Segundo OLIVEIRA (1958), esta forma clínica corresponde àqueles casos cuja evolução se mostrava lenta e que, em determinado momento, na ausência de complicação reconhecível, apresentaram acentuada agravação em seu

estado, instalando-se um quadro similar ao da forma subaguda. Na série do autor, apenas 6 casos puderam ser englobados dentro deste tipo evolutivo. O estudo histológico revelou miocardite crônica com reativação em todos os casos deste grupo, em 2 deles identificaram-se formas leishmanióides do *T. cruzi* parasitando fibras miocárdicas.

CHAGAS (1911) individualizou uma forma crônica da Tripanosomose americana que se distingue pelo aparecimento de sintomas agudos ou subagudos, principalmente a febre, e seu prognóstico é desfavorável.

III - Cardiopatia Chagásica Crônica Descompensada

OLIVEIRA (1958) inclui neste grupo aqueles pacientes com insuficiência cardíaca de intensidade variável que mostram um curso clínico de evolução bem mais lenta, por muito tempo respondendo satisfatoriamente à orientação terapêutica habitual. Na série do autor, 60 pacientes foram incluídos nesse grupo. O estudo anatomopatológico foi realizado em 16 pacientes. Apenas 2 casos apresentaram características morfológicas de miocardite crônica com sinais evidentes de reativação. Em 9 casos o quadro era característico de miocardite crônica, nos 5 restantes observaram-se focos isolados de reativação superpostos à miocardite crônica.

IV - Cardiopatia Chagásica Crônica Compensada

Compreende os casos cujo diagnóstico de cardiopatia foi

realizado, principalmente, através do eletrocardiograma, não havendo manifestações de insuficiência cardíaca (OLIVEIRA, 1958).

V - Forma Digestiva

São considerados nesta forma clínica os *megas*, principalmente o megaesófago e o megacolon.

2.2 ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

Durante a fase aguda da infecção, existe uma relação evidente entre as lesões inflamatórias e a presença de parasitas intracelulares (ANDRADE, 1982). Isto não significa que as lesões sejam exclusivamente produzidas pela rotura mecânica das células após a multiplicação parasitária. Nas lesões agudas, demonstrou-se, por imunofluorescência, presença de imunoglobulinas depositadas sobre o *T.cruzi* em áreas de acúmulo de polimorfonucleares, sugerindo fortemente uma reação humoral do tipo II com formação local de imunocomplexos (ANDRADE, 1969).

Os parasitas, ao romperem as células do hospedeiro, podem ativar mediadores químicos da inflamação ou podem liberar produtos lisossomais após a sua própria desintegração. Também ocorre, na fase aguda da infecção, a destruição de células não parasitadas (ANDRADE, 1982). Se isto se dá através de mecanismos inespecíficos do processo inflamatório ou por anoxia ou por uma agressão citotóxica específica, ainda não está definido.

Na miocardite da fase aguda da Doença de Chagas, observa-se um processo inflamatório intenso e extenso, no qual

predominam os monócitos, histiócitos, linfócitos, neutrófilos, células plasmáticas e eosinófilos. Estas células penetram o endomício e se escalonam ao longo dele ou formam acúmulos, mascarando as fibrocélulas, dissociando-as e separando-as dos capilares. O próprio edema intersticial que ocorre na região colabora na dissociação das fibras cardíacas. Essa distribuição do exsudato inflamatório e a tendência a dissecar as fibras miocárdicas caracterizam a miocardite aguda da Doença de Chagas. As lesões da fase crônica (miocardite crônica difusa) são caracterizadas por uma infiltração difusa de células mononucleares onde predominam as células linfóides. Existem quatro características microscópicas importantes:

- a) o infiltrado tende a mostrar áreas de adensamento focais, muitas vezes em correlação com focos de destruição tecidual;
- b) há fibrose intersticial fina acelular, que tende a envolver cada fibra cardíaca;
- c) há congestão e edema de todo o miocárdio;
- d) nota-se extrema escassez ou ausência de parasitas intracelulares. Trata-se de uma agressão difusa, inflamatória-fibrosante, continuada, não dependente diretamente da presença de parasitas (ANDRADE, 1982).

Tanto na forma indeterminada como na cardíaca, tem sido documentado que todo o sistema imune está igualmente mobilizado. Há produção de anticorpos contra o *T. cruzi* e de autoanticorpos contra estruturas do músculo cardíaco e esquelético (EVI) (COSSIO et al., 1974); nervos (ATHANAZIO et al., 1979); colágeno (SZARFMAN et al., 1979); e núcleos (SZARFMAN et al., 1975).

2.3 COMPLEMENTO E DOENÇA DE CHAGAS

A ativação do complemento quer seja pela via clássica quer pela via alternativa participa na lise da forma tripomastigota sangüínea do *T. cruzi* tanto *in vivo* como em *in vitro*; a via alternativa, porém, parece ter maior importância (BUDZKO et al., 1975; KRETTLI et al., 1979). No hospedeiro não imune o sistema complemento apresenta mecanismos de defesa de grande importância para a eliminação do *T. cruzi*. A destruição do parasita pode resultar da formação do CLM gerado através da ativação principalmente da via alternativa do complemento, e da fagocitose pelas células inflamatórias que são atraídas ao local da reação através dos produtos quimiotáticos gerados durante a ativação do complemento (KIPNIS; DIAS DA SILVA, 1989).

No hospedeiro imune, a fixação dos parasitas opsonizados aos fagócitos pode ser realizada através do receptor Fc que se liga especificamente à cadeia pesada da IgG ou através de C3b (receptor de C3b, CR1) após a clivagem de C3 pela C3 convertase. MOTA; UMEKITA (1989) observaram que camundongos com completa depleção de C3 não são capazes de eliminar as tripomastigotas sangüíneas na presença de anticorpos anti *T. cruzi*. Isto ilustra o papel importante de C3 na eliminação das tripomastigotas da circulação.

Embora o complemento participe na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. cruzi*, mediando a lise e favorecendo a fagocitose das tripomastigotas sangüíneas, além de atuar como um importante mediador da resposta inflamatória favorecendo a eliminação dos parasitas; nem todos os parasitas são eliminados da corrente sanguínea durante a evolução da doença.

Os mecanismos de evasão das formas tripomastigotas à resposta imune do hospedeiro não são ainda bem conhecidos.

Estas formas apresentam resistência à ação lítica do complemento e à fagocitose, o que favorece a sua persistência infectando cronicamente o hospedeiro.

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO *Trypanosoma cruzi* À LISE MEDIADA POR COMPLEMENTO

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* possuem componentes na sua superfície celular que interferem na ativação do complemento. Estas substâncias exercem sua ação:

- a) interferindo na formação da C3 convertase ou bloqueando sua atividade enzimática sobre o componente C3;
- b) promovendo a degradação da C5 convertase;
- c) atuando como receptores C3b like;
- d) acelerando a degradação da C3 convertase das vias clássica e alternativa através do fator TDAF (fator da tripomastigota com atividade DAF-like).

Estes componentes da superfície celular da tripomastigota estão envolvidos no mecanismo de resistência da tripomastigota contra a lise pela via alternativa na ausência de anticorpos específicos (KRETTL; NUSSENZWEIG, 1977; KIPNIS et al., 1981). Vários estudos têm demonstrado que as formas tripomastigotas podem ser transformadas em ativadores da via alternativa do complemento mediante pré-tratamento enzimático com tripsina e sialidase (KIPNIS et al., 1981); com soro imune (BUDZKO et al., 1975); isotipos de IgG ou seus respectivos fragmentos F(ab')₂, Fab' e Fab (KIPNIS et al., 1985) e IgM ou seus fragmentos Fab_μ (KIPNIS et al., 1987); e o aquecimento a 45 °C por 10 minutos em solução salina (KIPNIS et al., 1986).

Os procedimentos acima referidos removeriam os componentes da superfície celular das formas tripomastigotas do

T. cruzi que interfeririam na ativação do complemento. KIPNIS et al. (1985) sugerem que os anticorpos líticos contra o *T. cruzi* transformariam as tripomastigotas em ativadores da via alternativa através do bloqueio desses componentes de superfície.

Outros autores observaram que uma glicoproteína obtida a partir de um homogeneizado de diferentes cepas de tripomastigotas inibiu a formação da C3 convertase da via alternativa de maneira "dose dependente" (FISCHER et al., 1988). Esta glicoproteína difere de algumas proteínas reguladoras do complemento (H, DAF, MCP e CR1) em que é incapaz de favorecer a degradação da C3 convertase pré-formada da via alternativa, não atua analogamente ao fator I para mediar a clivagem de C3b e não possui atividade inibitória da C3 convertase da via clássica.

O efeito inibitório desta glicoproteína parece ser mais dependente da interação com o fator B do que com o C3b, proporcionando às tripomastigotas um mecanismo adicional de escape da lise pelo complemento através da via alternativa (FISHER et al., 1988).

As formas epimastigotas do *T. cruzi* são suscetíveis à lise pela via alternativa do complemento (NOGUEIRA et al., 1975). Estudos mais recentes por SHER et al. (1986) têm indicado que estas formas diferenciam-se das formas tripomastigotas, as quais expressam na sua superfície proteínas que bloqueiam a lise pela via alternativa do complemento.

A resistência das formas tripomastigotas à lise mediada por complemento varia de acordo com a cepa do *T. cruzi*. Alguns estudos têm demonstrado cepas altamente suscetíveis à lise por

complemento (STEFANI et al., 1983) e outras mais resistentes (KRETTLI et al., 1979). Estes trabalhos demonstraram que em condições ótimas para lise por anticorpos e complemento, 60 a 90% das formas tripomastigotas resistentes, não foram lisadas.

3 OBJETIVO DO ESTUDO

A evolução da Doença de Chagas tem se mostrado bastante polimórfica. Questiona-se se a evolução da doença para a forma indeterminada (benigna) representaria uma maior resistência destes pacientes, a qual seria determinada geneticamente.

Considerando-se a importância do sistema complemento nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T.cruzi*, o objetivo do presente trabalho foi investigar o papel imunogenético dos alelos de BF, C3, C2, C4A e C4B no desenvolvimento da Doença de Chagas, o qual pudesse representar susceptibilidade ou resistência para a evolução polimórfica deste tipo de pacientes.

Dada a alta incidência da Doença de Chagas no nosso meio, reverte-se de fundamental importância estudos que possam colaborar para um melhor conhecimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença e de sua evolução.

4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Foram estudados 100 pacientes chagásicos, os quais tiveram seu diagnóstico confirmado por pelo menos 2 testes sorológicos (imunofluorescência para Chagas e Hemaglutinação Indireta), sendo que só foram aceitos no estudo pacientes com imunofluorescência para Chagas com títulos $\geq 1/40$.

As fontes de obtenção dos pacientes chagásicos foram: Ambulatório de Cardiologia do Hospital de Clínicas da UFPR, Enfermaria de Clínica Médica e de Cirurgia do Aparelho Digestivo da UFPR, Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e Paraná Clínicas.

Todos os pacientes realizaram: eletrocardiograma em repouso, RX de tórax e esofagograma. Se havia queixas intestinais era realizado também o enema opaco. Este último exame não era realizado rotineiramente, devido ao desconforto de sua execução e das custas que implicaria.

Numa segunda etapa, os pacientes que não apresentavam alterações nos exames realizados, eram novamente contactados para realização de ecocardiograma uni e bidimensional com Doppler. Foram considerados como chagásicos "forma indeterminada" 43 pacientes os quais apresentavam eletrocardiograma em repouso, RX torax, esofagograma, enema opaco (quando realizado) e ecocardiograma bidimensional com Doppler normais.

Cinquenta e sete pacientes foram considerados como chagásicos "forma cardíaca" sendo que 21 (36,84%) apresentavam

algum distúrbio de condução atrioventricular ou intraventricular; 12 (21,05%) arritmia cardíaca; 10 (17,54%) arritmia cardíaca e insuficiência cardíaca; 10 (17,54%) arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca e distúrbio de condução e 4 (7,03%) arritmia cardíaca e distúrbio de condução. Durante a evolução do estudo, 4 pacientes chagásicos "forma cardíaca" foram a óbito. A idade média dos pacientes chagásicos como um todo foi de 41 anos. Os chagásicos considerados como "forma indeterminada" apresentaram uma idade média de 38 anos e os de "forma cardíaca" uma idade média de 44 anos, sendo que a idade média dos pacientes que foram a óbito durante a realização do estudo foi de 38 anos.

Em relação ao sexo 65% dos pacientes chagásicos eram do sexo masculino, sendo que entre eles 36 (55,38%) tinham a forma cardíaca e 29 (44,62%) a forma indeterminada. Os 35% restantes eram do sexo feminino e entre eles 21 (60%) tinham a forma cardíaca e 14 (40%) a forma indeterminada.

Considerando a origem étnica, 5% dos pacientes chagásicos eram brancos europeus, 49% brancos brasileiros, 44% mulatos e 2% negros. A classificação racial dos pacientes foi feita de acordo com a cor da pele, traços fisionômicos e ascendência, sendo que como brancos brasileiros foram classificados os indivíduos brancos cujos ancestrais estavam já pelo menos 4 gerações no Brasil, e que não conheciam a história de sua origem. Como brancos europeus foram classificados os indivíduos brancos com origem européia conhecida. Os indivíduos mulatos, médios e negros foram classificados segundo as características fisionômicas e cor da pele.

Dos pacientes chagásicos forma cardíaca 48 (84,22%) eram do Norte do Paraná; 7 (12,28%) de Minas Gerais; 1 (1,75%)

de Pernambuco; e 1 (1,75%) do Rio Grande do Sul. Dos pacientes chagásicos forma indeterminada 34 (79,06%) eram do Norte do Paraná; 3 (6,97%) de Minas Gerais; 2 (4,65%) de São Paulo; 1 (2,33%) do Amazonas; 1 (2,33%) do Rio Grande do Sul; 1 (2,33%) de Belém e 1 (2,33%) do Uruguai.

Todos os pacientes foram interrogados quanto à provável data que teriam sido contaminados pelo *T. cruzi*. No grupo dos chagásicos forma cardíaca esta informação foi impossível de ser obtida em 6 (10,52%) pacientes os quais negavam conhecer o Triatomíneo; 3 destes pacientes eram do Norte do Paraná, 1 de Pernambuco, 1 do Rio Grande do Sul e 1 de Minas Gerais. Os 51 (89,48%) pacientes restantes do grupo de chagásicos forma cardíaca referiam conhecer o triatomíneo e, segundo o levantamento realizado, o tempo médio entre a possível época de contaminação com o *T. cruzi* e a realização do estudo foi de 35 anos.

No grupo dos chagásicos forma indeterminada esta informação foi impossível de ser obtida em 4 (9,30%) pacientes pelo mesmo motivo referido acima; 2 destes pacientes eram do Norte do Paraná, 1 de Minas Gerais e 1 do Rio Grande do Sul. Os 39 (90,70%) pacientes restantes do grupo de chagásicos forma indeterminada referiam conhecer o triatomíneo e, pelos dados obtidos, o tempo médio entre a possível época de contaminação com o *T. cruzi* e a realização do estudo foi de 30 anos.

A Hipertensão Arterial Crônica controlada esteve presente como doença concomitante em 6 (10,52%) dos chagásicos forma cardíaca e em 3 (6,97%) dos chagásicos forma indeterminada.

No grupo de chagásicos forma cardíaca, 1 (1,75%) paciente apresentava alteração na contratilidade esofágica

observada no esofagograma; 1 (1,75%) megaesofago e 1 (1,75%) paciente com câncer de esofago.

4.2 CONTROLES

Como controles foram incluídos no estudo 100 indivíduos adultos normais, pareados com a máxima proximidade possível com a amostra dos pacientes segundo a origem étnica, sexo, idade e origem geográfica. A fonte de obtenção dos controles foi o Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFPR, portanto, indivíduos sabidamente com sorologia negativa para Chagas.

A idade média dos controles foi de 34 anos sendo 68% do sexo masculino e 32% do sexo feminino.

Considerando o grupo étnico, 5% dos controles eram brancos europeus; 49% brancos brasileiros; 44% mulatos e 2% negros. A classificação racial dos controles foi semelhante à dos pacientes.

Em relação à origem geográfica, todos os controles eram do Paraná.

4.3 PLASMA E SORO

Foram coletados 20 ml de sangue venoso de todos os pacientes e controles. Dez ml eram colocados em tubo sem anticoagulante e 10 ml em tubo com EDTA 0,2 M, pH 7,4. O tubo sem anticoagulante era deixado em banho maria a 37°C durante 30 minutos ou até retração completa do coágulo.

Posteriormente, era deixado na geladeira durante 1 hora (4°C) e a seguir centrifugado sendo o soro dividido em alíquotas que eram armazenadas a temperatura de -80°C até sua utilização.

O tubo com EDTA era colocado no gelo logo após a coleta do sangue e deixado na geladeira (4°C) por período máximo de 1 hora quando a amostra era centrifugada e o plasma aliquotado. As alíquotas de plasma eram também armazenadas a -80°C até sua utilização.

4.4 TIPAGEM DO FATOR B (BF)

Foi realizada através de técnica de imunoeletroforese de alta voltagem, seguida de imunofixação de acordo com ALPER et al. (1972).

Inicialmente foi preparada a placa com gel contendo 0,8% de agarose (Seakem ME, Marine Colloids, USA). Utilizou-se 35 ml do gel de agarose sobre uma placa de vidro medindo 19 cm x 10 cm. Esta placa com gel foi colocada na geladeira por 30 minutos até completada polimerização.

Em cada orifício do gel foram colocados 3 microlitros de soro.

As cubas laterais da câmara de eletroforese (LKB-Pharmacia, Uppsala, Suécia) foram completadas com solução tampão pH 8,6 (0,0008M de lactato de cálcio + 0,023M de barbital sódico + 0,0037M de ácido barbitúrico em água bidestilada) e o gel foi colocado sobre a placa de refrigeração (8 °C) localizada entre as cubas com tampão. Como ponte entre o gel e o tampão utilizou-se papel filtro Whatmann nº 3.

Após realizado todo este procedimento, o aparelho de eletroforese foi regulado para 400 V, 100 mA e 40 W deixando a placa correr por 2:30 horas. Após a eletroforese, o gel foi fixado com 150 µl do anticorpo anti-BF (Atlantic Antibodies, USA) diluído em 150 µl de solução salina, sendo aplicado sobre

o gel com auxílio de um bastão de vidro. Após 60 minutos de imunofixação em câmara úmida, a 37 °C, a placa foi colocada em uma câmara com solução salina durante 18 horas. Em seguida, a placa foi coberta com papel filtro e uma tampa de vidro e pressionada com 2 quilos de peso durante 5 minutos e posteriormente secada em estufa a 37°C. Após a secagem, a placa foi corada com solução corante (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma, St. Louis, USA + 450 ml etanol 96% + 100 ml ácido acético glacial + 450 ml água destilada) durante 20 minutos e em seguida descorada com solução descorante (etanol 96% + ácido acético glacial + água destilada) por aproximadamente 10 minutos. Finalmente, a placa foi lavada com água corrente, visualizando-se as variantes de BF.

4.5 TIPAGEM DE C3

Foi realizada através de técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Seakem ME, Marine Colloids, USA) sob alta voltagem (400 V, 100 mA, 40 W) e constante refrigeração a 4°C, de acordo com Teisberg (1970). É uma técnica muito semelhante àquela descrita para a tipagem de BF, com algumas variações.

Para C3, em cada orifício do gel, foram colocados 10 µl do soro e após a eletroforese, a placa foi fixada numa solução fixadora de C3 (45% de metanol, 10% de ácido acético, em água destilada) durante 20 minutos.

Posteriormente, a placa foi lavada em água corrente sob imersão por 10 minutos.

A secagem e coloração da placa foi realizada mediante procedimento já descrito para BF.

Finalmente, a placa era lavada em água corrente visualizando-se as variantes de C3.

4.6 TIPAGEM DE C2

A tipagem de C2 foi realizada no Laboratório de Genética do Complemento do Instituto de Microbiologia Médica da Universidade de Colônia, Alemanha. Foi empregado o método de focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, seguida por camada hemolítica de acordo com ALPER (1976).

O gel foi preparado utilizando-se 30 ml de solução acrilamida-N,N'-Methylene-bis-acrilamida, 1,5 ml Ampholine pH 5-7, 250 µl Ampholine pH 3,5-10, 15 µl de TEMED (N,N,N'-tetrame-tiletilenodiamina) e 8 ml Riboflavina-5-fosfato (1 mg%). (Pharmacia, Uppsala, Suécia).

Após polimerização do gel, 20 µl de plasma foram aplicados à 1,5 cm do ânodo, utilizando-se papel de cromatografia Whatman nº 1, em seguida foi submetido à focalização durante 3 horas a 1.500 V e temperatura de 4 °C. A solução utilizada no ânodo foi 0,4 M de Hepes (N-2-Hydroxietil-piperazine-N'-2-ácido etano sulfônico, Sigma) e no cátodo 0,1 M de NaOH.

A camada hemolítica foi preparada adicionando a um gel de Agarose a 0,6% (Seakem) em tampão veronal contendo íons Mg^{++} e Ca^{++} , eritrócitos de carneiro sensibilizados (EA) e soro humano normal (12 ml de células EA numa concentração de 5×10^8 células/ml, 600 µl de um pool de soro humano normal e 22,5 ml de gel de agarose).

As variantes de C2 foram observadas através da indução de hemólise por C2, na camada de gel contendo eritrócitos sensibilizados e soro humano normal, após incubação em câmara úmida a 37 °C por 60 minutos.

Finalmente, o gel foi fixado por 20 minutos numa solução contendo 12 ml de glutaraldeído (Sigma) e 300 de solução salina.

4.7 TIPAGEM DE C4

Foi realizada em colaboração com o Instituto de Microbiologia Médica e Higiene, de Colônia, Alemanha. As amostras foram transportadas até Colônia em gelo seco.

Os alótipos de C4 foram determinados utilizando-se a técnica de eletroforese de alta voltagem, seguida de imunofixação com anti-soro específico anti-C4 humano (Atlantic Antibodies, USA) e teste funcional hemolítico, segundo MAUFF et al. (1978) e AWDEH; ALPER (1980a).

Amostras de 45 µl de plasma foram tratadas previamente com 5 µl de neuraminidase e 5 µl de carboxipeptidase B (Sigma USA) e 5 µl das amostras já tratadas foram colocadas a seguir em gel contendo 0,75% de agarose (Seakem ME). O tampão utilizado foi o tampão veronal tris/glicina pH 8,8-8,9 (0,2M de TRIS, 0,37M de glicina, 0,03M de barbital sódico, 0,008 ácido barbitúrico) e o aparelho de eletroforese foi regulado para 400 V e 50-75 mA sob constante refrigeração, durante 3 horas.

Após a eletroforese o gel foi imunofixado com 200 µl de anti-C4 humano, diluídos 1:3 em PBS por 90 minutos à temperatura ambiente. Logo a seguir, mediante lavagem com PBS, por 18 horas, foi retirado o excesso de proteína. Finalmente, o gel era pressionado, secado e após corado por 30 minutos, com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) e descorado.

Para o teste hemolítico, bandas separadas eletroforeticamente eram incubadas em câmara úmida, durante aproximadamente 60 minutos com uma camada "overlay" de gel contendo 4% de eritrócitos de carneiro sensibilizados, e 3% de soro de cobaia deficiente em C4. Após a visualização das bandas hemolíticas, a camada de gel contendo o sistema hemolítico foi então retirada

e fixada em PBS com 1% de glutaraldeído, pressionada e secada a temperatura ambiente.

Para a definição de alguns alelos foi realizado Western Blot com anticorpos monoclonais contra C4A e C4B (anti-C4A/Rg 1,2) 99 H7 Biotest Offenbach, Alemanha; e anti C4B/ch1/Biotest 1228, Alemanha), e ou eletroforese prolongada, de acordo com DOXIADES & CROSSE-WILDE (1990).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alotípicas e alélicas de C2, C3, BF, C4A e C4B, foram determinadas pela contagem direta.

Através do cálculo do chi-quadrado mínimo (MAUFF, 1986), foi observado se a população em estudo estava em equilíbrio de acordo com a Lei de Hardy-Weinberg.

O teste do chi-quadrado e a avaliação da probabilidade estatística determinada através do teste exato de Fisher (SIEGEL, 1979) foram utilizados com a finalidade de comparar a frequência dos fenótipos de C2, C3, BF, C4A e C4B entre os pacientes chagásicos de forma clínica cardíaca com os de forma indeterminada e entre os chagásicos como um todo, Chagas forma cardíaca, forma indeterminada e controles. O nível de significância utilizado foi de 5%; o risco relativo foi calculado apenas nos casos com significância estatística, quando também foi realizada a correção para o número de alelos testados (p corrigido).

5 RESULTADOS

Os resultados da presente investigação demonstraram um aumento significativo do alótipo C3 F nos pacientes com forma cardíaca (14,3%) quando comparados com os controles (5%) ($p = 0,0494$) e pacientes com forma indeterminada (0%) ($p = 0,008$). Considerando a correção para o número de alelos testados (pc) a significância do aumento do alótipo C3 F apenas persiste nos pacientes com forma cardíaca quando comparados com os de forma indeterminada ($pc = 0,016$). Os demais alótipos de C3 não apresentaram frequências com diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles estudados (Tabelas 1 e 2). O risco relativo de um indivíduo portador do alótipo C3 F de vir a desenvolver a Doença de Chagas na sua forma cardíaca da doença é de 3,1 quando comparado com os controles. Observa-se na Foto 1 alótipos de C3 detectados através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose.

Na análise da distribuição dos alótipos de BF observou-se uma frequência significativamente menor do alótipo BF S nos pacientes com Chagas forma cardíaca (19/57, 33,33%) e no grupo de Chagas total (38/100, 38%) quando comparados com os controles (55%) ($p = 0,0143$ e $p = 0,0233$, respectivamente) (Tabela 3). Considerando a correção para o número de alelos testados (pc), a significância persiste nos pacientes com forma cardíaca quando comparados com os controles ($pc < 0,0429$). O

risco relativo de um indivíduo portador do alotipo BF S desenvolver a Doença de Chagas forma cardíaca é de 0,41 quando comparado com os controles. Por outro lado, considerando a população total de chagásicos em estudo, os indivíduos com alotipo BF S apresentam um risco relativo de 0,5 de adquirir a doença quando comparados com o grupo controle.

Os alelos raros de BF* (S07, S05 e F1) apresentaram-se com uma frequência aumentada nos pacientes cardíacos (4/57, 7%), nos indeterminados (6/43, 13,9%) e Chagas total (10/100, 10%) quando comparados com os controles normais (4/100, 4%), porém sem significância estatística. Observa-se na Foto 2 alótipos de BF detectados através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose, seguida de imunofixação.

A distribuição dos alótipos de C2 e de C4 não apresentou nenhum resultado com diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Tabelas 5 e 6). Contudo, observou-se um aumento do alelo raro C4B*11 nos pacientes com a forma indeterminada (4/43, 9,3%), forma cardíaca (2/57, 3,5%) e Chagas total (6/100, 6%) quando comparados com os controles (2/100, 2%). O alelo nulo de C4B (C4B*Q0) apresentou-se também aumentado nos pacientes com a forma cardíaca (16/57, 28%) quando comparados com os de forma indeterminada (4/43, 16%) e com os controles (19/100, 19%). Estes resultados, entretando, não foram estatisticamente significantes. Os alelos raros C4A*12, A*91, B*4, B*5 e B*6 foram observados somente nos pacientes.

Observou-se curiosamente a presença do haplótipo raro C4B11BFS07 em 3 (6,98%) dos 43 pacientes com forma indeterminada e quando presente nunca esteve associado com o

alótipo C3F. Nenhum dos pacientes cardíacos e controles normais apresentaram este haplótipo (Tabelas 7 e 8).

Nas Fotos 3 e 4 pode-se observar alótipos de C4A e C4B observados após eletroforese em gel de agarose seguida de imunofixação, com soros tratados com neuraminidase e carboxipeptidase.

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALOTÍPICA DE C3 ENTRE PACIENTES COM CHAGAS FORMA CARDÍACA, FORMA INDETERMINADA, CHAGAS TOTAL E CONTROLES

Alótipo	Chagas Forma Cardíaca				Chagas Forma Indeterminada				Chagas Total				Controles	
	n	%	p	rr	n	%	p	rr	n	%	p	rr	n	%
C3 S	39	68,42	ns	-	30	69,77	ns	-	69,0	69	ns	-	73	73,0
C3 SF	10	17,55	ns	-	13	30,23	ns	-	23,0	23	ns	-	22	22,0
C3 F	8	14,03	0,0494*	3,10	0	0	ns	-	8,0	8	ns	-	5	5,0
Total	57	100	-	-	43	100	-	-	100	100	-	-	100	100

ns = não significativo para nível de significância de 5%;

rr = risco relativo;

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher, quando comparados com os controles.

* = (pc = 0,0988)

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALOTÍPICA DE C3 ENTRE PACIENTES COM FORMA CARDÍACA E FORMA INDETERMINADA DE CHAGAS

Alotipo	Chagas Forma Cardíaca		Chagas Forma Indeterminada		p	rr
	n	%	n	%		
C3 S	39	68,42	30	69,77	ns	-
C3 SF	10	17,55	13	30,23	ns	-
C3 F	8	14,03	0	0	0,008 (pc=0,016)	
Total	57	100	43	100	-	-

ns = não significativo para nível de significância 5%;

rr = risco relativo;

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher

pc = p corrigido para o número de alelos testados.

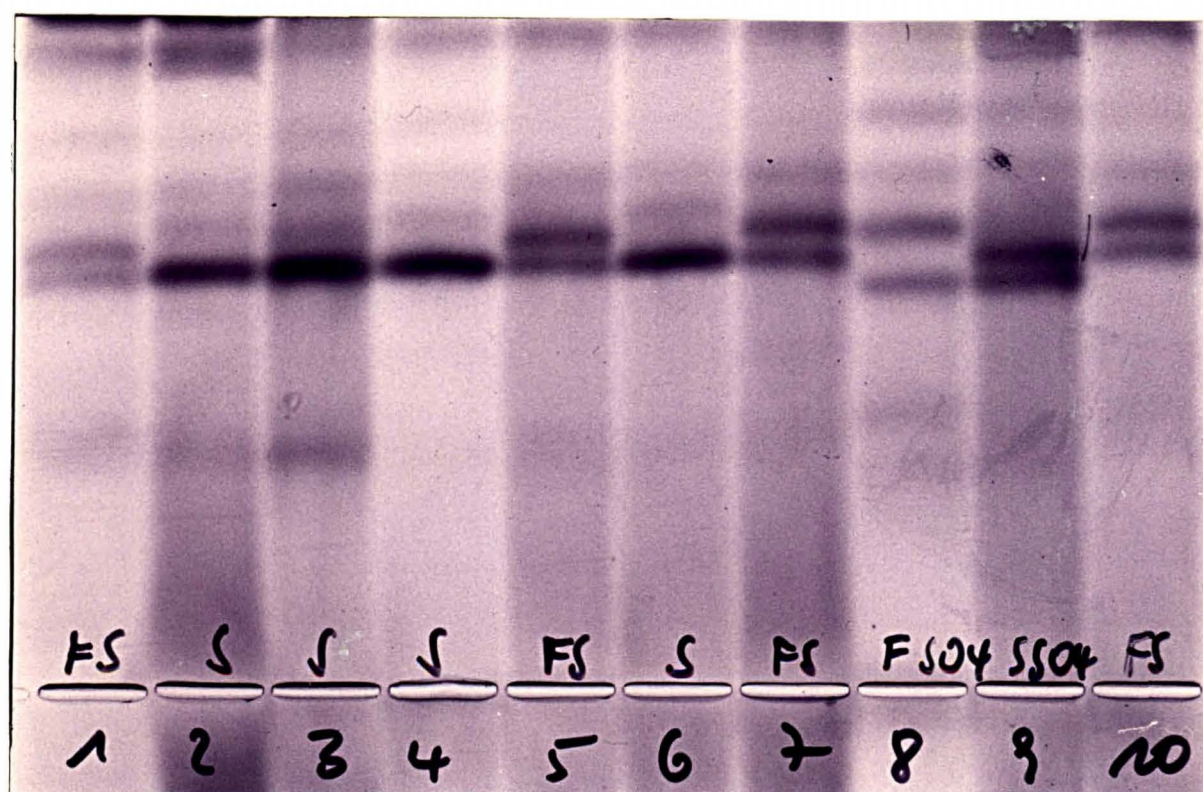


Foto 1 - Alótipos de C3 detectados através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALOTÍPICA DE BF ENTRE PACIENTES COM CHAGAS FORMA CARDÍACA, FORMA INDETERMINADA, CHAGAS TOTAL E CONTROLES

Alótipo BF	Chagas Forma Cardíaca				Chagas Forma Indeterminada				Chagas Total				Controles	
	n	%	p	rr	n	%	p	rr	n	%	p	rr	n	%
S	19	33,33	0,0143 ¹	0,41	19	44,18	ns	-	38	38,0	0,023 ²	0,50	55	55,0
SF	22	38,60	ns	-	14	32,56	ns	-	36	36,0	ns	-	31	31,0
F	12	21,05	ns	-	4	9,30	ns	-	16	16,0	ns	-	10	10,0
SS07	2	3,52	ns	-	2	4,65	ns	-	4	4,0	ns	-	1	1,0
SF1	0	0,0	ns	-	1	2,33	ns	-	1	1,0	ns	-	1	1,0
FS07	0	1,75	ns	-	2	4,65	ns	-	2	2,0	ns	-	2	2,0
FS05	1	1,75	ns	-	0	0,0	ns	-	1	1,0	ns	-	0	0,0
FF1	1	1,75	ns	-	1	2,33	ns	-	2	2,0	ns	-	0	0,0
Total	57	100			43	100			100	100	100		100	100

1 = (pc = 0,0429)

2 = (pc = 0,069)

ns = não significativo para nível de significância de 5%;

rr = risco relativo;

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher, quando comparados com os controles;

pc = p corrigido para o número de alelos testados.

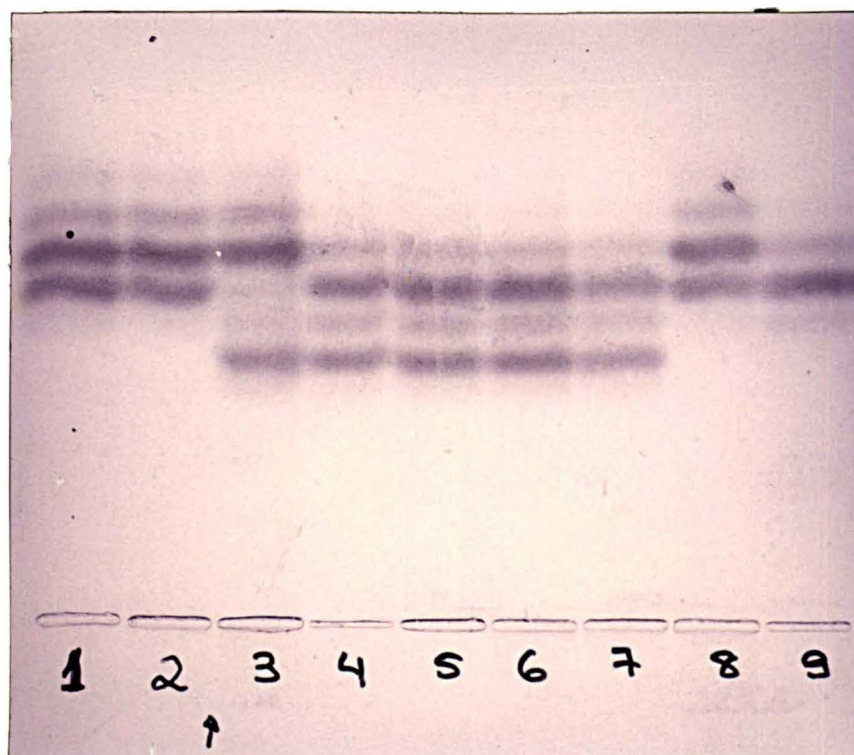


Foto 2 - Alótipos de BF detectados através de eletroforese de alta voltagem em gel de agarose e imunofixação
(1,2,8=SF; 3=FS07; 4,5,6,7=SS07; 9=S)

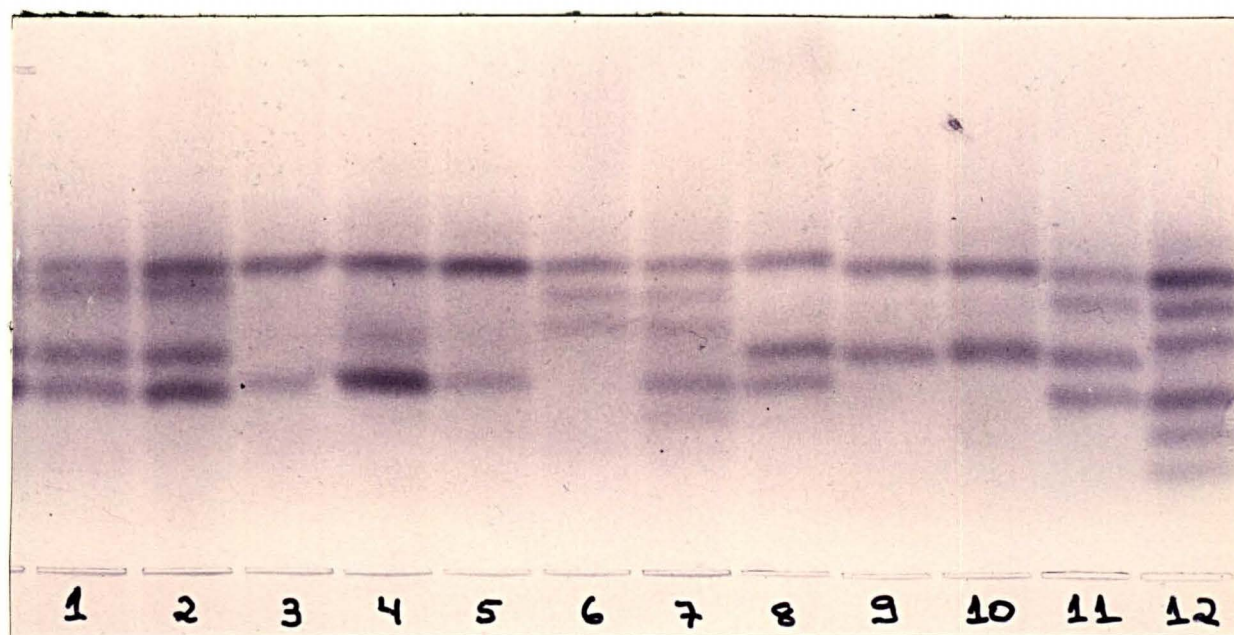


Foto 3 - Alótipos de C4A e C4B observados após eletroforese em gel de agarose seguida de imunofixação, com soros tratados com neuraminidase (6, 7, 12) e neuraminidase + carboxipeptidase (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11). (1, 2, 11 = A3, 2 B1, 2); (3, 4, 5, 7, 12 = A3 B1); (6 = A3 BQ0); (8 = 4A B2,1); (9 = A3 B2); (10 = A3 B22,2).

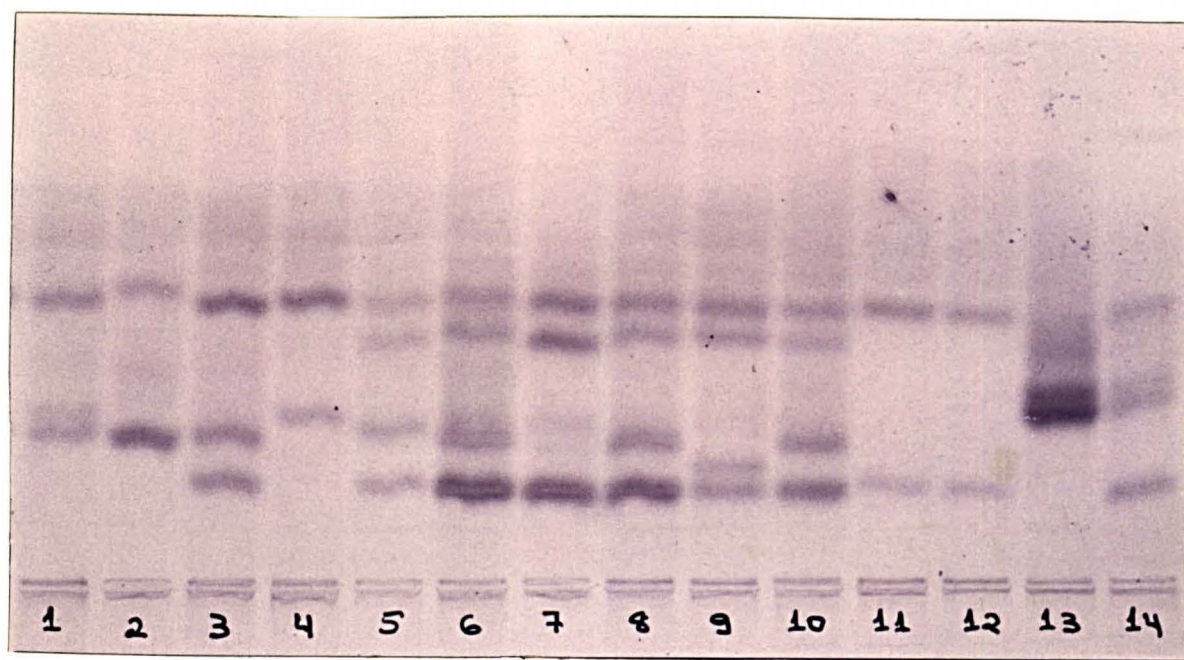


Foto 4 - Alótipos de C4A e C4B observados após eletroforese prolongada, seguida de imunofixação, utilizando-se soros tratados com neuraminidase e carboxipeptidase.

(1 = A3 B22,2); (2 = A4 B2) (3 = A3 B2,1); (4 = A3 B22); (5, 6, 10 = A3, 2 B2,1); (7 = A3,2 B1); (8 = A3, 22, B2, 1); (9 = A3,22 B11,1); (10 = A3,2 B2,1); (11,12 = A3 B1); (13 = A91,12 BQ0); (14 = A3, 12, 91, B1).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALOTÍPICA DE BF ENTRE PACIENTES COM FORMA CARDÍACA E FORMA INDETERMINADA DE CHAGAS

Alotipo BF	Chagas Forma Cardíaca		Chagas Forma Indeterminada		p
	n	%	n	%	
S	19	33,33	19	44,18	ns
SF	22	38,60	14	32,56	ns
F	12	21,05	4	9,30	ns
SS07	2	3,52	2	4,65	ns
SF ₁	0	0,0	1	2,33	ns
FS07	0	0,0	2	4,65	ns
FS05	1	1,75	0	0,0	ns
FF1	1	1,75	1	2,33	ns
Total	57	100	43	100	

ns = não significativo para nível de significância 5%;

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALOTÍPICA DE C2 ENTRE PACIENTES COM CHAGAS FORMA CARDÍACA, FORMA INDETERMINADA, CHAGAS TOTAL E CONTROLES

Alótipo C2	Chagas Forma Cardíaca			Chagas Forma Indeterminada			Chagas Total			Controles	
	n	%	p	n	%	p	n	%	p	n	%
C	54	94,74	ns	41	95,35	ns	95	95,0	ns	94	94,0
BC	3	5,26	ns	2	4,65	ns	5	5,0	ns	5	5,0
B1	0	0	ns	0	0	ns	0	0,0	ns	1	1,0
Total	57	100	-	43	100	-	100	100	-	100	100

ns = não significativo para nível de significância de 5%;

p = probabilidade estatística obtida do teste de Fisher, quando comparados com os controles.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO ALOTÍPICA DE C2 ENTRE PACIENTES COM FORMA CARDÍACA E FORMA INDETERMINADA DE CHAGAS

Alotipo	Chagas Forma Cardíaca		Chagas Forma Indeterminada		p
	n	%	n	%	
C2 C	54	94,74	41	95,35	ns
C2 BC	3	5,26	2	4,65	ns
Total	57	100	43	100	-

ns = não significativo para nível de significância 5%;

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ALGUNS ALÓTIPOS DE C4B ENTRE PACIENTES COM CHAGAS FORMA CARDÍACA, FORMA INDETERMINADA, CHAGAS TOTAL E CONTROLES

Alótipo	Chagas Forma Cardíaca			Chagas Forma Indeterminada			Chagas Total			Controles	
	n	%	p	n	%	p	n	%	p	n	%
B0a	16	28,07	0,2654	7	16,28	0,8804	21	21,0	0,8597	19	19,0
B11	2	3,51	0,4607	4	9,30	0,0668	6	6,0	0,1395	2	2,0
B11 S07*	0	0	0,4042	3	6,97	0,1602	3	3,0	0,5000	2	2,0

ns = não significativo para nível de significância de 5%;

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher, quando comparados com os controles;

* = haplótipo C4B11 BFS07

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE ALGUNS ALOTIPOS DE C4B ENTRE PACIENTES COM FORMA CARDÍACA E FORMA INDETERMINADA DE CHAGAS

Alotipo	Chagas Forma Cardíaca		Chagas Forma Indeterminada		p
	n	%	n	%	
BQo	16	28,07	7	16,28	0,2513
B11	2	3,51	4	9,30	0,2164
B11 S07*	0	0	3	6,97	0,0763

p = probabilidade estatística obtida do teste exato de Fisher;

* = haplótipo C4B11 BFS07

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE C3, BF E C2 EM PACIENTES CHAGÁSICOS FORMA CARDÍACA, FORMA INDETERMINADA, CHAGAS TOTAL E CONTROLES

Alelos		Forma Cardíaca	Forma Indeterminada	Chagas Total	Controles
C3	S*	0,7719	0,8488	0,805	0,84
	F*	0,2281	0,1512	0,195	0,16
	Total	1	1	1	1
BF	S*	0,5701	0,6860	0,62	0,73
	F*	0,4299	0,3140	0,38	0,27
	Total	1	1	1	1
C2	C*	0,9736	0,9767	0,975	0,97
	B*	0,0264	0,0233	0,025	0,03
	Total	1	1	1	1

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GÊNICAS DE C4A E C4B EM PACIENTES CHAGÁSICOS FORMA CARDÍACA, FORMA INDETERMINADA, CHAGAS TOTAL E CONTROLES

Alelos		Forma Cardíaca	Forma Indeterminada	Chagas Total	Controles
C4A*	A1	-	-	-	0,0050
	A2	0,1228	0,1279	0,125	0,0900
	A3	0,7105	0,6860	0,695	0,6700
	A4	0,0526	0,0814	0,065	0,1150
	A5	-	-	-	0,0100
	A6	0,0088	-	0,005	0,0100
	A12	0,0088	0,0116	0,010	-
	A91	0,0088	-	0,005	-
	AQ0	0,0614	0,0930	0,080	0,0900
	DA	0,0614	-	0,015	0,0100
	TOTAL	1	1	1	1
C4B*	B1	0,6875	0,7093	0,680	0,6800
	B2	0,0625	0,0930	0,115	0,1500
	B3	0,0625	0,0116	0,035	0,0300
	B4	-	0,0116	0,005	-
	B5	-	0,0116	0,005	-
	B6	0,0104	-	0,005	-
	B11	0,0208	0,0465	0,03	0,0050
	B22	-	0,0116	0,005	0,0050
	B28	-	-	-	0,0150
	BQ0	0,1562	0,0930	0,115	0,1000
	DB	-	0,0116	0,005	0,1500
	TOTAL	1	1	1	1

DA, DB = alelos duplicados; Q0 = alelos nulos

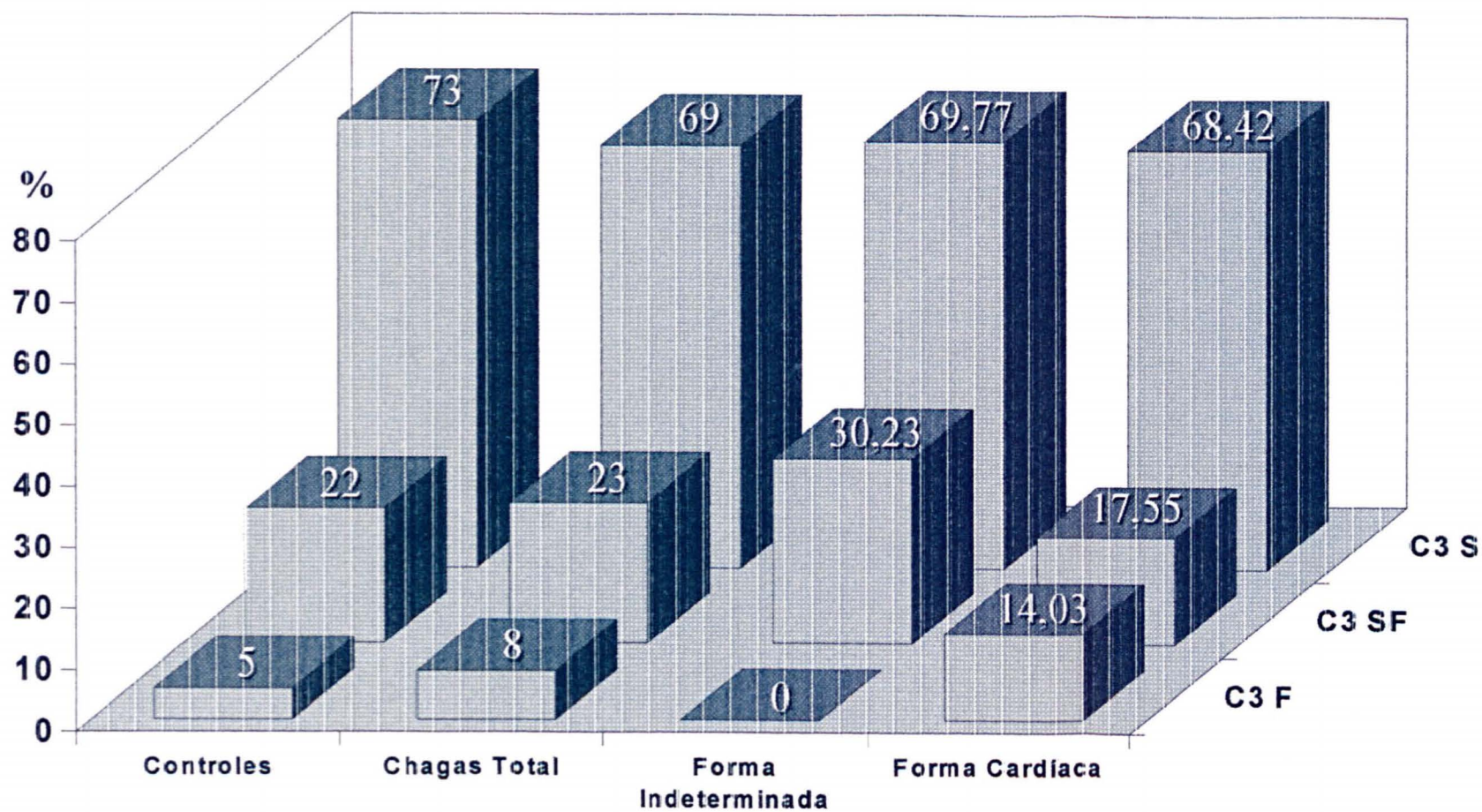


Gráfico 1 - Distribuição dos alótipos de C₃ nos pacientes chagásicos forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles.

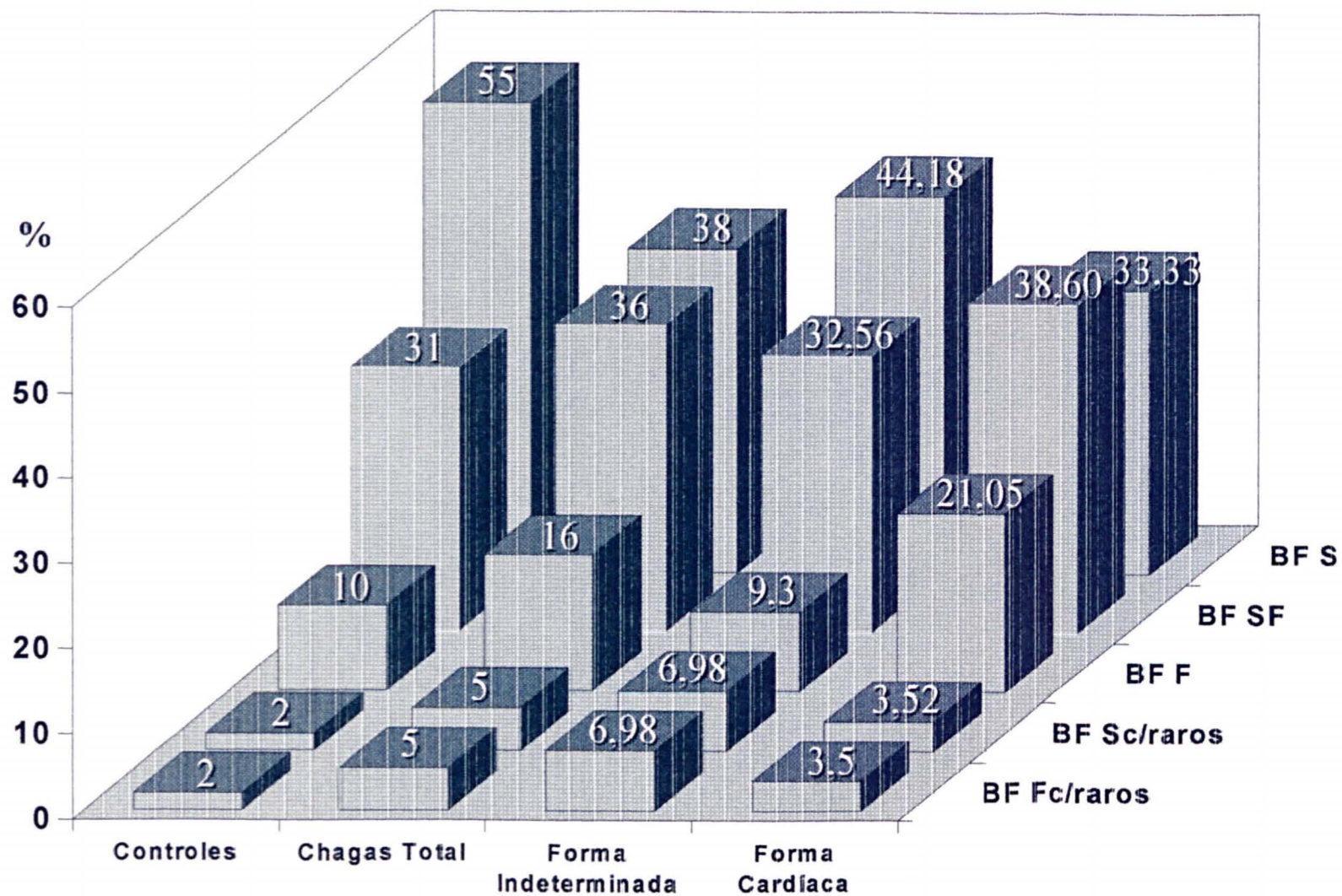


Gráfico 2 - Distribuição dos alótipos de BF nos pacientes chagásicos forma cardíaca, forma indeterminada, Chagas total e controles.

6 DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da Doença de Chagas humana. Durante seu ciclo evolutivo, o *T. cruzi* prolifera no intestino do inseto vetor na forma epimastigota e após sua diferenciação surge a forma tripomastigota que é a forma infectante do hospedeiro vertebrado.

O sistema complemento é considerado um dos primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro não imune. Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o sistema complemento é ativado sendo a via alternativa de grande importância. A destruição do patógeno pode resultar de uma ação combinada do efeito lítico do complexo C5b-C9 e da fagocitose pelas células inflamatórias atraídas por agentes quimiotáticos, alguns gerados pela ativação do sistema complemento (KIPNIS; DIAS DA SILVA, 1989). Durante a evolução da doença, observa-se que nem todas as tripomastigotas são eliminadas da corrente sanguínea devido a mecanismos ainda não suficientemente conhecidos.

A forma epimastigota do *T. cruzi* é eficientemente lisada pelo soro humano mediante a ativação, principalmente, da via alternativa do complemento. É também susceptível à fagocitose e destruição pelos monócitos e macrófagos (SHER et al., 1986).

Embora a lise mediada por complemento, dependente de anticorpo, no hospedeiro imune, seja um importante mecanismo efetor da resistência *in vivo*, algumas tripomastigotas escapam

deste processo persistindo por longo tempo no hospedeiro infectado cronicamente, apesar da presença de anticorpos específicos contra os antígenos de superfície do parasita (KRETTLI, 1982).

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos pelos quais as formas tripomastigotas do *T.cruzi* conseguem evadir a lise e fagocitose mediada por complemento. KRETTLI; DE CARVALHO (1985), estudando tripomastigotas sangüíneas mantidas num meio livre de complemento e posteriormente tratadas com soro humano normal fresco, observaram uma forte aglutinação destas na presença de anticorpo anti-C3. Os autores sugeriram, pelos seus achados, a existência de receptores para C3b e C3bi na superfície destes parasitas. C3b uma vez fixado seria inativado para C3bi possivelmente por uma enzima derivada do próprio parasita. Posteriormente, os fragmentos de C3 com seus respectivos sítios de ligação seriam liberados da superfície do parasita formando complexos antígeno-anticorpo insolúveis. Este mecanismo seria parte da defesa natural do *T.cruzi* contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e poderia influenciar a extensão e natureza dos eventos iniciais durante a infecção pelo *T.cruzi* permitindo a evasão das tripomastigotas da destruição pela via alternativa do complemento.

JOINER et al. (1986) demonstraram que C3 se deposita 5 vezes mais eficientemente nas formas epimastigotas do que nas tripomastigotas na presença de soro humano normal. A glicoproteína (GP₇₂), principal glicoproteína de superfície do parasita, é o local de preferência para a ligação do C3b na forma epimastigota porém, na forma tripomastigota é ineficiente

na ligação de C3. Os autores observaram que as formas tripomastigotas apresentam como principal local de ligação de C3 uma molécula de 25-30 KDa, que se comportam como não ativadores da via alternativa do complemento. Os autores sugerem que a ligação de C3 nas formas tripomastigotas não é eficiente na formação da C3 convertase da via alternativa pelo fato de não favorecer a ligação de C3 com o fator B, antes leva a sua inativação através dos fatores H e I (JOINER et al., 1986).

JOINER et al. (1987) demonstraram que as tripomastigotas liberam no meio de cultura componentes com peso molecular variando principalmente entre 87-93.000, os quais aceleram a degradação intrínseca da C3 convertase da via clássica e alternativa, de maneira análoga ao fator acelerador da degradação (DAF).

FISCHER et al. (1988) evidenciaram a existência de uma glicoproteína de superfície (GP 58/68) presente em tripomastigotas do *T.cruzi* que inibe especificamente a formação da C3 convertase da via alternativa, através de sua atuação sobre o fator B prevenindo sua ligação a C3b.

Como pode ser visto, o *T.cruzi* tenta evadir a ação lítica do complemento através das suas proteínas de superfície ou secretadas, que inibem principalmente a formação da C3 convertase da via alternativa do complemento, seja atuando sobre o fator B ou C3. Certamente este mecanismo de escape do *T.cruzi* à ação lítica do complemento é um fator de notável importância na cronificação da Doença de Chagas.

A evolução da Doença de Chagas é polimórfica e depende de muitos fatores, sendo influenciada provavelmente pela cepa e

quantidade de parasitas infectantes, e sem dúvida por características próprias do hospedeiro, herdadas geneticamente e que participam da sua defesa imunológica.

Três componentes do complemento, Fator B (BF) da via alternativa de ativação; C2 e C4 da via clássica, são codificadas por genes situados na região do CPH do homem, no braço curto do cromossoma 6. Estes componentes do complemento são atualmente designados como produtos gênicos da classe III do CPH.

C3 é o mais abundante componente do complemento presente no soro. É codificado por um único locus localizado no cromossoma 19 e participa da formação da C3 convertase da via clássica e alternativa sendo o componente central da ativação de ambas as vias.

O poliformismo dos componentes do complemento e sua associação com várias doenças tem sido extensamente estudado (Quadro 4). Até o momento, não se encontram na literatura estudos da associação entre o polimorfismo genético dos componentes do complemento e a Doença de Chagas. Porém, este tipo de estudo já foi realizado em doenças infecciosas como Paracoccidioidomicose brasileira (de MESSIAS et al., 1991a), meningite bacteriana (ROWE et al., 1989), bacteremia por encapsulados (BISHOF et al., 1990) entre outras (Quadro 4).

No presente estudo foram determinados os alótipos dos componentes C2, C3, C4A, C4B e BF em 100 pacientes chagásicos, 57 (57%) na forma cardíaca e 47 (47%) na forma indeterminada; e em 100 indivíduos adultos normais como controles, pareados com a máxima proximidade possível com a amostra dos pacientes, segundo o grupo étnico, sexo, idade e origem geográfica.

Analisando a distribuição dos alelos de C2, C4A e de C4B entre os pacientes chagásicos forma cardíaca e os de forma indeterminada e entre os chagásicos como um todo, forma cardíaca, forma indeterminada e controles, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

Por outro lado, os alótipos C3 F e BF S apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto a sua distribuição nos grupos estudados. O aumento de C3 F nos pacientes com forma cardíaca quando comparados com os pacientes forma indeterminada e controles, sugere a participação deste alelo como marcador de susceptibilidade para a evolução da forma cardíaca da doença. O risco relativo de indivíduos portadores do alótipo C3F de desenvolverem a forma cardíaca da doença é 3,1. A diminuição de BF S nos pacientes forma cardíaca e Chagas total quando comparados com os controles, sugere a participação deste alótipo como marcador de resistência contra a aquisição da doença e sua evolução para a forma cardíaca. Indivíduos portadores do alótipo BFS apresentam um risco relativo de 0,5 de desenvolverem a Doença de Chagas e de 0,41 de desenvolverem na sua forma cardíaca de evolução. Após a correção para o número de alelos testados (pc), C3 F e BF S permanecem associados apenas com a forma de evolução da doença, mostrando-se C3 F como um marcador de susceptibilidade e BF S como um marcador de resistência para a evolução da forma cardíaca da doença.

Nossos resultados sugerem a importância da via alternativa do complemento na defesa contra o *T. cruzi*, pois justamente dos componentes aqui analisados, somente aqueles participantes da via alternativa mostraram resultados significativos.

A maneira pela qual estes alelos influenciam a susceptibilidade ou resistência na Doença de Chagas ainda não é conhecida. Cabe ressaltar que a associação aqui encontrada foi somente com os alelos C3*F e BF*S na sua forma homozigota de expressão; nos estados heterozigotos isto não ocorreu possivelmente devido ao equilíbrio gerado pelo outro alelo expresso. É provável que os alelos C3 F interajam de uma forma tal com as moléculas de ligação de C3 na membrana do *T.cruzi* que favoreça ainda mais a sua inativação pela ligação preferencial com os fatores H e I. Ainda existe a possibilidade de que enzimas inativadoras secretadas pelo parasita (DAF-like) (JOINER et al., 1987) possam reagir com maior avidez com os alelos C3 F na sua forma homozigota. Em ambos os casos, os alelos C3 F não favoreceriam a formação da C3 convertase da via alternativa e sendo a via alternativa do complemento um importante mecanismo de resistência natural e um dos primeiros mecanismos de defesa a serem acionados no hospedeiros recém-infectado, os alelos C3 F favoreceriam a evasão do parasita a ação lítica do complemento pela via alternativa levando a sua persistência no organismo e aparecimento da forma cardíaca da doença.

Seguindo o mesmo raciocínio, os alelos BF S poderiam favorecer uma ativação mais eficiente da via alternativa do complemento com a formação da C3 convertase da via alternativa e conseqüente eliminação do parasita. Sugere-se, portanto, que indivíduos portadores do alelo BF S na sua forma homozigota tenham uma maior resistência contra o aparecimento da forma cardíaca da doença.

Deve ser salientado que nenhum dos pacientes com forma cardíaca que apresentam o alótipo C3 F na forma "homizogota" é

portador "homozigótico" do alótipo BF S. Por outro lado, também foi observado no nosso estudo que nenhum dos pacientes com forma indeterminada que apresenta o alótipo BF S na forma "homozigota", é portador "homozigoto" do alótipo C3 F. Este é um importante fato que corrobora a influência de C3 F como marcador de susceptibilidade e BF S como marcador de resistência na evolução da forma cardíaca da doença.

A formação de uma C3 convertase efetiva da via alternativa depende de certos moduladores entre os quais estão os receptores celulares para fragmentos do complemento como o CR1, presentes nas células fagocíticas. O CR1 além de ser a estrutura ligante para C3b, atua como cofator para o fator I, o qual através da clivagem da cadeia α de C3b gera iC3b, que tem baixa afinidade para o CR1. Desta forma CR1 atua como modulador da ativação das vias clássica e alternativa do complemento inibindo a consequente formação do complexo de ataque à membrana (C5b-C9) (FEARON, 1983). ARVILOMMI (1974) demonstrou que os produtos resultantes da clivagem de C3 ligam-se de forma diferente a seus receptores nos monócitos, sendo esta ligação influenciada pelo fenótipo de C3.

Uma hipótese a ser levantada é que fragmentos de C3b dos alótipos C3F depositados sobre o parasita, poderiam ser mais susceptíveis a atuação do CR1 como cofator do fator I resultando numa ineficiente ativação do complemento e opsonização, permitindo uma maior evasão das formas tripomastigotas da lise pelo complemento e consequente fagocitose.

Neste mesmo raciocínio, os fragmentos Bb dos alótipos BF S integrantes da C3 convertase depositada sobre o parasita, poderiam oferecer maior resistência à atuação do CR1 sobre a

inibição desta enzima o que favoreceria a ativação do complemento com a conseqüente lise e fagocitose das formas tripomastigotas. Um fato importante que deve-se ressaltar é que o conjunto das diferentes formas polimórficas de diferentes marcadores tem um cunho mais importante na montagem da resposta imune do que a presença ou ausência de um alelo em particular. O conjunto das diferentes variantes alélicas de componentes do complemento como C4, C2, C3, fator B, imunoglobulinas e glicoproteínas de superfície celular em cada indivíduo poderia determinar a eficácia de ativação do complemento e de suas conseqüentes atividades biológicas. Assim o conjunto de certos haplótipos poderia favorecer, enquanto que outros poderiam ter um efeito inibidor sobre a ativação do complemento. É possível que os alótipos C3S, C3 SF e BFSF possam fazer parte de haplótipos que talvez, juntamente com outros marcadores como os antígenos do CPH, levariam a uma melhor defesa do hospedeiro contra o *T.cruzi*. Vários estudos têm comprovado a existência de haplótipos de alto risco para determinadas doenças (Quadro 3). Em relação à Doença de Chagas LLOP et al. (1988) estudaram a distribuição dos antígenos de classe I e II do CPH em 124 indivíduos com sorologia positiva para Chagas no Norte Chico do Chile e observaram uma diminuição significativa do haplótipo B40Cw3 em pacientes com cardiomiopatia. Com relação à evolução para a fase crônica da doença, podemos considerar além dos mecanismos de escape do parasita e da defesa ineficiente do hospedeiro na fase aguda, a participação de novos fenômenos como a autoimunidade, imunossupressão, onde novamente determinados haplótipos da classe I, II e III do CPH poderiam estar envolvidos.

A Doença de Chagas e sua evolução polimórfica tem fascinado os investigadores do mundo inteiro, gerando inúmeras pesquisas. Ainda assim, é de fundamental importância um maior número de trabalhos brasileiros visando o melhor entendimento dos mecanismos imunopatogênicos que permitem o escape do *T.cruzi* aos mecanismos de defesa do hospedeiro e da consequente cronificação da doença e evolução para a forma cardíaca, considerando ser o Brasil um dos países com maior número de chagásicos.

A determinação de marcadores genéticos indicativos de resistência ou susceptibilidade para a evolução da forma cardíaca da doença é de grande relevância para o acompanhamento do paciente e no âmbito da medicina trabalhista.

De acordo com os resultados aqui obtidos, novas linhas de pesquisas poderão ser desenvolvidas especialmente no que diz respeito ao estudo do efeito de soros C3 F e BF S sobre a lise e fagocitose do *T.cruzi*. A determinação da existência de haplótipos de alto risco, incluindo antígenos da classe I, II e III do CPH, como também de outros componentes do complemento poderá trazer novos marcadores indicativos de susceptibilidade ou resistência para a doença ou seu tipo de evolução.

O presente trabalho constitui apenas mais uma contribuição que corrobora a importância do sistema complemento, em especial da via alternativa, como mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T.cruzi*. A sensibilização provocada pelo atendimento de pacientes jovens incapacitados para o trabalho, para a procriação, e muitas vezes à beira da morte fizeram surgir em mim e certamente continuará surgindo em outros pesquisadores o interesse no estudo da Doença de Chagas.

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, chegamos às seguintes conclusões:

a) Uma associação positiva do alótipo C3 F nos pacientes com forma cardíaca, quando comparados com os controles e pacientes com forma indeterminada, leva a considerar este alelo como marcador de susceptibilidade para a evolução da forma cardíaca na Doença de Chagas, sendo que indivíduos portadores deste alótipo apresentam um risco relativo de 3,10 para o desenvolvimento da forma cardíaca da doença.

b) Quando considerada a correção para o número de alelos testados, a associação positiva de C3 F permaneceu nos pacientes com forma cardíaca, quando comparados com os pacientes de forma indeterminada, o que confirma este alelo como marcador de suscetibilidade para a evolução da forma cardíaca da Doença de Chagas.

c) Uma associação negativa do alótipo BF S nos pacientes com Chagas forma cardíaca e Chagas total quando comparados com os controles sugere este alelo como marcador de resistência contra a aquisição da doença e sua evolução para a forma cardíaca.

d) Quando considerada a correção para o número de alelos testados, a associação negativa de BF S permaneceu somente entre os pacientes com forma cardíaca quando comparados com os controles, o que corrobora o papel deste alelo como marcador de resistência contra a evolução da forma cardíaca da Doença de Chagas.

e) A análise da distribuição dos alelos de C2, C4A e C4B não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados o que reforça a importância da via alternativa do complemento nos mecanismos de defesa contra o *T.cruzi*.

f) Os resultados obtidos sugerem um papel imunogenético da via alternativa do Complemento na Doença de Chagas influenciando a forma clínica de evolução dos pacientes chagásicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNELLO, V.A. Complement deficiency states. Medicine (Baltimore), 57:1-23, 1978.
- AGNELLO, V.; GELL, J.; TYE, M.J. Partial genetic deficiency of the C4 component of complement in discoid lupus erythematosus and urticaria/angioedema. J. Am. Acad. Dermatol. 9:894-7, 1983.
- ALPER, C.A.; BOENISCH, T.; WATSON, L. Genetic polymorphism in human glycine-rich beta-glycoprotein. J. Exp. Med. 135:68-80, 1972.
- ALPER, C.A. Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and BF. J. Exp. Med. 144:1111-5, 1976.
- ALPER, C.A.; AWDEH, Z.L.; YUNIS, E.J. Complotypes and extended haplotypes in laboratory medicine. Complement Inflamm. 6:8-18, 1989.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Estudo imunocitoquímico da doença de Chagas experimental. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 11:44, 1969.
- ANDRADE, Z.A. Patogenia da doença de Chagas. Novos aspectos. Arq. Bras. Cardiol. 38:255-60, 1982.
- ARVILOMMI, H. Capacity of complement C3 phenotypes to bind mononuclear cells in man. Nature 251:740-774, 1974.
- ATHANAZIO, P.R.; HOFF, R.; ANDRADE, Z.A. EVI antibodies in individuals of the state of Bahia. Ann. Cong. Inter. on Chagas' disease. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1979.
- AWDEH, Z.L.; ALPER, C.A. Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement (C4). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3576-80, 1980a.
- AWDEH, Z.L.; RAUM, D.; GLASS, D.; AGNELLO, V.; SCHUR, P.H.; JOHNSTON, R.B. Jr. Complement-human histocompatibility antigen haplotypes in C2 deficiency. J. of Clin. Invest. 67:581-3, 1981a.

- AWDEH, Z.L.; RAUM, D.; FLEISCHNICK, E.; CRIGLER, J.F.; GERALD, P.S.; ALPER, C.A. MHC-linked complement haplotypes (complotypes) in congenital adrenal hyperplasia. Clin. Res. 29:287 A, 1981b.
- BENTLEY, D.R.; CAMPBELL, R.D.; CROSS, S.J. DNA polymorphism of the C2 locus. Immunogenetics 22:377-90, 1985.
- BERTRAMS, J.; OPFERKUCH, W.; GROSSE-WILDE, H.; LUBOLDT, W.; SCHUPPIEN, W.; KUWERT, E. C2 hypocomplementemia in multiple esclerosis. Lancet 2:1358-9, 1976.
- BERTRAMS, J.; DEWALD, G.; SPITZNAS, M.; RITTNER, C. HLA- A, B, C, DR, Bf and C2 alleles in insulin-dependent diabetes mellitus with proliferative retinopathy. Immunobiology 158:113-8, 1980.
- BISHOF, N.A.; WELCH, T.R.; BEISCHEL, L.S. C4B deficiency: a risk factor for bacteremia with encapsulated organisms. J. Infect. Dis. 162:248-50, 1990.
- BRÖNNESTAM, R. Studies of the C3 polymorphism. Relationship between C3 phenotypes and rheumatoid arthritis. Hum. Hered. 23:206-13, 1973.
- BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C.; KIERSZENBAUM, F. Effects of complement depletion in experimental Chagas disease: immunolysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Inf. and Imm. 11:86-91, 1975.
- CANÇADO, J.R. Doença de Chagas. Belo Horizonte: Fac. Med. Univ. Minas Gerais, 1968. 666p.
- CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem: resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3:219,75, 1911.
- COLTEN, H.R.; ALPER, C.A. Hemolytic efficiencies of genetic variants of human C3. J. Immunol. 108:1184-7, 1972.
- COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; ARANA, R.M. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation 50: 1252, 1974.
- COURA, J.R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H.P.F. Morbidade da doença de Chagas. I - Estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 78:363-72, 1983.
- CUNHA, C.L.P. Estudo doppler ecocardiográfico evolutivo da função ventricular na forma indeterminada da Doença de Chagas. Tese apresentada para o concurso de Professor Titular do Departamento de Clínica Médica - Doenças do Coração, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1992.

- DAY, N.K.; L'ESPERANCE, P.; GOOD, R.A.; MICHAEL, F.A.; HANSEN, J.A.; DUPONT, B.; JERSILD, C. Hereditary C2 deficiency: genetic studies and associations with the HLA system. J. Exp. Med. 141:1464-9, 1975.
- de MESSIAS, I.J.T.; REIS, A.; BRENDEN, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; MAUFF, G. Association of major histocompatibility complex class III complement components C2, BF and C4 with Brazilian paracoccidioidomycosis. Complement inflamm. 8:288-93, 1991a.
- de MESSIAS, I.J.T.; SANTAMARIA, J.; BRENDEN, M.; REIS, A.; MAUFF, G. Association of C4B deficiency (C4*Q0) with erythema nodosum in leprosy. Clin. Exp. Immunol. 92:284-7, 1993.
- DIERICH, M.P. The receptors. In: ROTHER, K.; TILL, G.O. The complement system. Heidelberg, Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1988. 535p.
- DISSING, J.; LUND, J.; SOERENSEN, H. C3 polymorphism in a group of old arteriosclerotic patients. Human Hered. 22:466-72, 1972.
- DOXIADES, G.; GROSSE-WILDE, H. Allotyping by prolonged gel electrophoresis and immunoblotting using monoclonal and policlonal antibodies. Complement Inflamm. 7:269-76, 1990.
- DUKOR, P.; HARTMAN, K.U. Bound C3 as the second signal for B cell activation. Cell Immunol. 7:349-55, 1973.
- DYER, P.A.; KLOUDA, P.T.; HARRIS, R.; MALLIEK, N.T. Properdin factor B alleles in patients with idiopathic membranous nephropathy. Tissue antigens 15:505-7, 1980.
- DYER, P.A.; GRENNAN, D.M.; WALTON, K.; KLIMIUK, P.; DODDS, W.W.; CLAGUE, R.; HARRIS, R. HLA and properdin factor B (BF) in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 43:118, 1984.
- EICHENFIELD, L.F.; JOHNSTON, R.B. Secondary disorders of the complement system. Am. J. Dis. Child 143:595-602, 1989.
- EINSTEIN, L.P.; HANSE, P.J.; BALLOW, M.; DAVIS, A.E.; DAVIS, J.S.; ALPER, C.A.; ROSEN, F.S.; COLTEN, H.R. Biosynthesis of the third component of complement (C3) *in vitro* by monocytes from both normal and homozygous C3-deficient humans. J. Clin. Invest. 60:963-9, 1977.
- FARHUD, D.D.; ANANTHAKRISHNAN, R.; WALTER, H.C. Association between C3 phenotype and various diseases. Human genetics 17:57-60, 1972.
- FEARON, D.T. Regulation by membrane sialic acid of B1H - dependent decay - dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75:1971-5, 1978.

- FEARON, D.T.; AUSTEN, K.F. Activation mechanisms of the alternative complement pathway and amplification step. In: BING, D.H. (ed.), The chemistry and physiology of the human plasma proteins. New York: Pergamon Press, 1979. p. 229-54.
- FEARON, D.T. The human C3b receptor. Springer Semin. Immunopathol. 6:159-72, 1983.
- FELDMAN, M.; PEPYS, M.B. Role of C3 in lymphocyte cooperation *in vitro*. Nature 249:159-61, 1974.
- FIELDER, A.H.L.; VAKARELIS, B.N.; BATCHELOR, J.R.; COMPSTON, D.A.S.; Mc DONALD, W.I. Optic neuritis and multiple sclerosis. Do factor B alleles influence progress of disease? Lancet 2:246, 1981.
- FIELDER, A.H.L.; WALPORT, M.J.; BATCHELOR, J.R.; RYNES, R.I.; BLACK, C.M.; DODI, I.A.; HUGHER, G.R.V. Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. Br. Med. J. 286:425-8, 1983.
- FISCHER, E.; OUAISSI, M.A.; VELGE, P.; CORNETTE, J.; KAZATCHKINE, M.D. GP 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. Immunology 65:299-303, 1988.
- FLEISCHNICK, E.; AWDEH, Z.L.; RAUM, D.; GRANADOS, J.; ALOSCO, S.M.; CRIGLER, J.F.; GERALD, P.S.; GILES, C.M.; YUNIS, E.J.; ALPER, C.A. Extended MHC haplotypes in 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia: shared genotypes in unrelated patients. Lancet 1:153-6, 1983.
- FORD, E.B. Polymorphism and taxonomy. In: HUXLEY, J. (ed). The new systematics. Clarendon, Oxford, pp 493-513, 1940.
- GIORGI, M.C.; MENEGUETTI, J.C.; HIRONAKA, F.H.; PEREIRA BARRETO, A.C.; ARTEAGA-FERNÁNDEZ, E.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F.; CAMARGO, E. Quantificação de captação miocárdica de gálio 67 em pacientes portadores de doença de Chagas. Arq. Bras. Cardiol. 45:132, 1985.
- GREINER, J.; WEBER, F.J.; MAUFF, G.; BAUR, M.P. Genetic polymorphisms of properdin factor B (BF), the second component (C2), and the fourth component (C4) of complement in leprosy patients and healthy controls from Thailand. Immunobiology 158:134-8, 1980.
- HARRIS, H. The principles of human biochemical genetics. Elsevier, Amsterdam: North Holland Biomechical Press., 1980.
- HAUPTMANN, G. Lupus erythemateux aigus et deficits hereditaires en complement. Ann. Dermatol. Syphil. 101: 479-96, 1974.

- JOINER, K.; SHER, A.; GAITHER, T.; HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding B factor. Immunology **83**:6593-7, 1986.
- JOINER, K.; RIMOLDI, M.T.; KIPNIS, T.; da SILVA, W.D.; HAMMER, C.H.; SHER, A. Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* produce molecules which accelerate the decay of complement C3 convertases. Complement **4**:175 (abstract), 1987.
- KAY, P.H.; McCLUSKEY, J.; CHRISTIANSEN, F.T.; FEENEY, D.; McCANN, V.J.; ZILKO, P.J.; DAWKINS, R.L.; O'NEILL, G.J. Complement allotyping reveals new genetic markers in rheumatoid arthritis and diabetes mellitus. Tissue Antigens **21**:159-60, 1983.
- KIPNIS, T.L.; DAVID, J.R.; ALPER, C.A.; SHER, A.; DIAS da SILVA, W. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. **78**:602-5, 1981.
- KIPNIS, T.L.; KRETTLI, A.U.; DIAS da SILVA, W. Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. Scand. J. of Immunol. **22**:217-226, 1985.
- KIPNIS, T.L.; TAMBOURGI, D.V.; SUCUPIRA, M.; DIAS da SILVA, W. Inhibition of C3 convertase formation of the complement classical pathway by *Trypanosoma cruzi* cell surface components. Brazilian J. of Med. and Biolog. Res. **19**:271-8, 1986.
- KIPNIS, T.L.; SUCUPIRA, M.; DIAS da SILVA, W. Transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote bloodstream forms by immune IgM and its Fab μ fragment into activators of the alternative complement pathway. Brazilian J. Med. Biol. Res. **20**:105-14, 1987.
- KIPNIS, T.L.; DIAS DA SILVA, W. Evasion of *Trypanosoma cruzi* from complement lysis. Brazilian J. Med. Biol. Res. **22**:1-16, 1989.
- KLOETZEL, K.; DIAS, J.C.P. Mortality in Chagas' disease life table for the period 1949-1967 in an unselected population. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo **10**:5, 1968.
- KOLB, W.P.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The membrane attack mechanism of complement. Isolation and subunit composition of the C5b-C9 complex. J. of Exp. Med. **141**:724-35, 1973.
- KRETTLI, A.U.; NUSSENZWEIG, R.S. Presence of immunoglobulins on the surface of circulating trypomastigotes fo *T. cruzi* resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis. Pan. Am. Health Org. Sci. Publ. **347**:71-3, 1977.

- KRETTLI, A.U.; WEISZ-CARRINGTON, P.; NUSSSENZWEIG, R.S. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. Clin. and Exp. Immunol. 37:416-23, 1979.
- KRETTLI, A.U. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in experimental and human infections. Afric. J. Clin. Exp. Immunol. 3:327, 1982.
- KRETTLI A.U.; PONTES de CARVALHO, L.C. Binding of C3 fragments to the *Trypanosoma cruzi* surface in the absence of specific antibodies and without activation of the complement cascade. Clin. Exp. Immunol. 62:270-77, 1985.
- LACHMANN, P.J.; KAY, A.B.; THOMPSON, R.A. The chemotactic activity for neutrophil and eosinophil leucocytes of the trimolecular complex of the fifth, sixth, and seventh components of human complement (C-5-6-7) prepared in free solution by the "reactive lysis" procedure. Immunology 19:895-9, 1970.
- LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOBREGA, G.C.; MIRANDA, A. Chagas' disease. A clinical, epidemiological and pathologic study. Circulation 14:1035-60, 1956.
- LLOP, E.R.; ROTHHAMMER, F.E.; ACUÑA, M.P.; APT, W.B. Antígenos HLA en cardiomiopatías chagásicas: evidencia en favor de una protección genética contra esta afección. Rev. Med. Chile 116: 211-4, 1988.
- MACEDO, V. Forma indeterminada da doença de Chagas. J. Bras. Med. 38:34-, 1980.
- MAUFF, G.; BENDER, K.; FISCHER, B. Genetic polymorphism of the fourth component of human complement. Vox Sang 34:296-301, 1978.
- MAUFF, G. The complement system: genetics and function. In: KOCIELAK, J.; WIKTOR-JEDREZEJCZAK, W.; KOTELBA-WITKOWSKA, B.; TRACZYK, Z. (eds). Trends in hematology. Warsaw: Institute of Hematology, 1985.
- MAUFF, G. Application to the MHC - class III complement markers to population genetics. In: E. Ohayon, A. Cambon. Thomsen (eds): Human population genetics. Paris: Les Editions INSERM, 1986. p.143.66.
- MAUFF, G.; ALPER, C.A.; DAWKINS, R.; DOXIADES, G.; GILES, C.M.; HAUPTMANN, G.; RITTNER, C.; SCHNEIDER, P.M. C4 nomenclature statement. Complement Inflamm. 7:261-8, 1990.
- McCLUSKEY, J.; McCANN, V.J.; KAY, P.H.; ZILKO, P.J.; CHRISTIANSEN, F.T.; O'NEILL, G.J.; DAWKINS, R.L. HLA and complement allotypes in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 24:162-5, 1983.

- MCLEAN, R.H.; KENNEDY, T.L.; BALLOW, M.; GAUDIO, K.M.; SIEGEL, N.J. Increased frequency of factor B fast variant (BF F) in the idiopathic nephrotic syndrome. Disease Markers 1:25, 1983.
- MECKERT, P.C.; AHONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; CHAMBO, J.; LEVIN, M.; LAGUENS, R.P. *Trypanosoma cruzi*: aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules in skeletal and heart muscle cells of chronically infected mice. Exp. Paras. 72:8-14, 1991.
- MIGONE, N.; MALAVASI, F.; BOSCHIS, D.; MODENA, V. BF polymorphism and ankylosing spondylitis. Lancet 2:163, 1978.
- MOLLENHAUER, E.; SCHMIDT, R.E.; HEINRICHS, M.; RITTNER, C. Scleroderma: possible significance of silent alleles at the C4B locus. Arthritis Rheum. 27:711-2, 1984.
- MOTA, I.; UMEKITA, L.F. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. Immunology Letters 21: 223-6, 1989.
- NERL, C.W.; MAYEUX, R.; O'NEILL, G.J. Complement C4 allotypes in Alzheimer's disease. Lancet 21:1343, 1982.
- NOGUEIRA, N.; BIANCO, C.; COHN, Z. Studies of the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. J. of Exp. Med. 142:224-9, 1975.
- OLIVEIRA, P.F. Formas clínico-evolutivas da cardiopatia chaqásica crônica. Tese de concurso à Docência Livre da Cadeira de Clínica Propedêutica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1958.
- O'NEILL, G.J.; POLLACK, M.S.; YANG, S.Y.; LEVINE, L.S.; NEW, M.I.; DUPONT, B. Gene frequencies and genetic linkage disequilibrium for the HLA-linked genes BF, C2, C4S, C4F, 21-hydroxylase deficiency and glyoxalase. I. Transplantation Proceedings 11:1713-5, 1979.
- O'NEILL, G.J.; MINITER, P.; POLLACK, M.S.; DUPONT, B. Different HLA antigen associations for the functionally active and inactive products of the complement C4F1 allele. Human Immunology 1: 23-30, 1980.
- O'NEILL, G.J.; DUPONT, B.; POLLACK, M.S.; LEVINE, L.S.; NEW, M.I. Complement C4 allotypes in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: further evidence for different allelic variants at the 21-hydroxylase locus. Clin. Immunol. and Immun. 23:312-22, 1982a.
- O'NEILL, G.J.; NERL, C.; KAY, P.H.; CHRISTIANSEN, F.T.; McCLUSKEY, J.; DAWKINS, R.L. Complement C4 is a marker for adult rheumatoid arthritis. Lancet 2:214, 1982c.

- OWEN, F.; LOFTHOUSE, R.; CROW, T. Properdin factor B and glyoxalase I polymorphism in celiac disease. N. Eng. J. Med. 303:530, 1980.
- PEPYS, M.B. Role of complement in induction of antibody production *in vivo*. J. Exp. Med. 140:126-34, 1974.
- PEREIRA BARRETTO, A.C. Aspectos polimórficos da cardiopatia na forma indeterminada da doença de Chagas. Estudo através de métodos não invasivos. Tese docência-livre, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- PEREIRA, J.B.; WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Morbidade da doença de Chagas. III. Estudo longitudinal, de seis anos, em Virgem da Lapa, MG, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80:63-71, 1985.
- PEREIRA BARRETO, A.C.; AMATO NETO, V. Subsídios para nova conceituação da forma indeterminada da doença de Chagas. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo 41:249-53, 1986.
- PRATA, A. Prognóstico e complicações da doença de Chagas. Rev. Goiana Med. 5:87-96, 1959.
- RAUM, D.; ALPER, C.A.; STEIN, R.; GABBAY, K.H. Genetic marker for insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 2:1208-10, 1979.
- RITTNER, C.; MEIER, E.M.M.; STRADMANN, B.; GILES, C.M.; KÖCHLING, R.; MOLLENHAUER, E.; KRETH, H.W. Partial C4 deficiency in subacute sclerosing panencephalitis. Immunogenetics 20:407-15, 1984c.
- RITTNER, C.; STRADMANN-BELLINGHAUSEN, B. C3 reference typing report and nomenclature revision. Complement Inflamm. 7:230-3, 1990.
- ROWE, P.C.; McLEAN, R.H.; WOOD, R.A.; LEGGIADRO, R.J.; WINKELSTEIN, J.A. Association of homozygous C4B deficiency with bacterial meningitis. J. Infect. Dis. 160:448-51, 1989.
- SANDERS, P.A.; THOMSON, W.; DYER, P.A.; GRENNAN, D.M. Haplotypes bearing HLA-A, -B, and -DR: BF and C4 genes in rheumatoid arthritis families. Tissue Antigens, 33:21-9, 1988.
- SCHIFFERLI, J.A.; PACCAUD, J.P. Two isotypes of human C4. C4A and C4B have different structure and function. Complement Inflamm. 6:19-26, 1989.
- SCHIOTZ, P.O.; HIOBY, N.; NORLING, N.; SØRENSEN, H. C3 polymorphism in a Danish cystic fibrosis population and its possible association with antibody response. Hum. Hered. 28:293-300, 1978.

- SCHROEDER, R.; ZANDER, H.; ANDREAS, A.; MAUFF, G. Multiple sclerosis: immunogenetic analysis of sibpair doublecase families. II. Studies on the association of multiple sclerosis with C2, C4, BF, C3, C6 and Gm polymorphisms. Immunobiology 164:160-70, 1983.
- SHER, A.; HIENY, S.; JOINER, K. Evasion of the alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: dependence on the developmentally regulated synthesis of surface proteins and N-linked carbohydrate. J. Immunol. 137:2961-7 1986.
- SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica. Editora McGraw-Hill do Brasil Ltda., 1979.
- SORENSEN, H.; DISSING, J. Association between the C3F genes and arteriosclerotic vascular diseases. Human Heredity 25:279-83, 1975.
- STEFANI, M.M.A.; TAKEHARA, H.A.; MOTA, I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Immunology Letter 7:91-7, 1983.
- SUNDSDO, J.S. The leukocyte complement system. Fed. Proc. 41:3094-8, 1982.
- SZARFMAN, A.; COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; SEGAL, A.; de la VEGA, M.T.; ARANA, R.M.; SCHMUNIS, G.A. Immunological studies in Rockland mice infected with *T. cruzi*. Development of antinuclear antibodies. Biomedicine, 22:489, 1975.
- SZARFMAN, A.; PERALTA, M.; CORDEIRO LIMA, N.F.; SAVINO, W.; COURA, J.R.; RENNARD, S. Connective tissue antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. Ann. Cong. Inter. on Chagas' disease. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1979.
- TAKEUCHI, F.; MIMORI, A.; MATSUTA, K.; NAKANO, K.; MIYAMOTO, T.; MATSUKI, K.; JUJI, T.; MAEDA, H.; OMOTO, K.; TOKUNAGA, K. Association of complement alleles C4AQO and C4B5 with rheumatoid arthritis in Japanese patients. Arthritis Rheum. 32:691-8, 1989.
- TEISBERG, P. High voltage agarose gel electrophoresis in the study of C3 polymorphism. Vox Sang 19:47-56, 1970.
- TEISBERG, P.; ALAISEN, B.; NORDHAGEN, R.; THORSBY, E.; GEDDE-DAHL T. JR. A hemolytically non-active C4 gene product. Immunobiology 158:91-5, 1980.
- WANK, R.; SCHENDEL, D.J.; O'NEILL, G.J.; RIETHMÜLLER, G.; HELD, E.; FEUCHT, H.E. Rare variant of complement C4 is seen in high frequency in patients with primary glomerulonephritis. Lancet 1:872-3, 1984.
- WARLOW, R.S.; UKO, G.; McCLUSKEY, J.; KAY, P.H.; CHRISTIANSEN, F.T.; DAWKINS, R.L. Extractable nuclear antigens (ENA) auto antibodies in SLE: an immunogenetic relationship with HLA, C4 and BF alleles. Clin. Exp. Immunol. 63:419-27, 1985.